

Laura Karjalainen

Entsymbaattisen Abbott Architect c8000 HbA_{1c} -menetelmän validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

25.11.2013

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Laura Karjalainen Entsymaattisen Abbott Architect c8000 HbA _{1c} -menetelmän validointi 67 sivua + 2 liitettä 25.11.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratoriola
Ohjaajat	Erikoistutkija Jaana Leiviskä Laboratorioinsinööri Miika Kuivikko
<p>Opinnäytetyö suoritettiin THL:n Tautiriskiyksikön analyttisen biokemian laboratoriossa (TLAB). Työssä validoitiin uusi entsyymaattinen Abbott Architect c8000 HbA_{1c} -menetelmä, jota käytetään diabetekseen liittyvissä tutkimuksissa. Validoinnilla haluttiin varmistaa uuden mittaustekniikaltaan erilaisen menetelmän toimivuus. Menetelmävertailussa komparatiivisena menetelmänä oli laboratoriossa rutiinikäytössä ollut Abbottin immunoturbidimetrisen HbA_{1c}-menetelmä. Uusi entsyymaattinen menetelmä perustuu HbA_{1c}:n β-ketjun N-terminaalisten fruktosyylidipeptidien spesifiseen mittaukseen. Näytteet voidaan esikäsittää manuaalisesti tai ajaa suoraan automaattisella kokoverisovelluksella.</p> <p>HbA_{1c}-menetelmää käytetään kliinisissä laboratorioissa glykoituneen hemoglobiini A_{1c}:n prosentuaalisen tai mmol/mol-osuuden kvantitatiiviseen <i>in vitro</i> -määrittelyyn ihmisperäisistä kokoverinäytteistä. HbA_{1c}-määrittelyä käytetään apuna diabeteksen diagnosoinnissa, diabetes-riskipotilaiden tunnistamisessa ja jo todettujen diabetespotilaiden pitkäaikaisen sokeritasapainon seurannassa. Erilaiset hemoglobiinipoikkeavuudet, kuten esimerkiksi tietyissä etnisissä ryhmissä esiintyvät hemoglobiнопатiat, voivat häiritä määrittelyä johtaen virheellisen mataliin tai korkeisiin tuloksiin erityisesti immunologisissa menetelmissä.</p> <p>Tulosten oikeellisuutta (poikkeama) tarkasteltiin vertaamalla saatuja analyysituloksia Lab-qualityn HbA_{1c}-kierrosnäytteisiin, joille on annettu ERLGH-referenssiarvot. Toistettavuutta arvioitiin ajamalla eri tason kontrollinäytteitä 10 päivän ajan. Lisäksi tutkittiin mahdollista siirtymävirhettä ja yksilöllisen kädenjäljen vaikutusta esikäsittelyvaiheessa. Menetelmän lineaarisuutta testattiin lineaarisuusmittausarjan avulla. Hemolysaattinäytteiden säilyvyyttä tutkittiin sekä huoneenlämmössä että jääkaapissa. Menetelmävertailussa ajettiin viiden päivän aikana neljästä eri kansallisuusryhmästä (suomalaiset, venäläiset, somalit ja kurdit) yhteensä 100 näytettä. Lopuksi laskettiin menetelmän mittausepävarmuus.</p> <p>Menetelmä oli lineaarinen koko mittausalueella, toistettavuus erittäin hyvä ja tarkkuus asetetuissa rajoissa. Tulostaso oli tilastollisesti merkitsevästi matalampi kuin vanhalla menetelmällä, mutta menetelmien välinen lineaarinen korrelaatio hyvä. Yksittäisistä näytteistä saatiin eri menetelmillä poikkeavia tuloksia, syynä voi mahdollisesti olla jokin hemoglobiнопатia tai muu häiriötekijä. Mittausepävarmuusarvio (n. 8 %) oli pienempi kuin vanhalla menetelmällä. Laimentamista ei suositella, koska se voi vaikuttaa laskennalliseen suhteeseen. Siirtymävirhettä ei havaittu ja hemolysaattien säilyvyys oli hyvä. Validoinnin perusteella menetelmä täyttää sille asetetut vaatimukset ja voidaan ottaa käyttöön.</p>	
Avainsanat	HbA _{1c} , validointi, entsyymaattinen menetelmä, diabetes

Author Title Number of Pages Date	Laura Karjalainen Validation of New Enzymatic Abbott Architect c8000 HbA _{1c} Assay 67 pages + 2 appendices 25 November 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jaana Leiviskä, Senior Researcher Miika Kuivikko, Laboratory Engineer
<p>The aim of this thesis was to validate the new enzymatic Abbott Architect c8000 HbA_{1c} assay. The study was done at the National Institute for Health and Welfare (THL) in the laboratory of analytical biochemistry (TLAB). The purpose of the validation was to ensure that the new commercial off the shelf assay was functioning reliably and accurately. The comparative method was the old Abbott immunoturbidimetric HbA_{1c} assay routinely used at the laboratory. The new enzymatic method measures specifically <i>N</i>-terminal fructosyl dipeptides of the β-chain of HbA_{1c}. Pretreatment of the human whole blood specimen can be done manually for the Hemolysate application or automatically on the system for the Whole Blood application.</p> <p>HbA_{1c} assay is used in clinical laboratories for the quantitative <i>in vitro</i> measurement of glycated hemoglobin A1c percent or HbA_{1c} fraction (mmol/mol). Measurements are used as an aid in the diagnosis of diabetes, to identify patients at risk for developing diabetes and for the monitoring of long-term blood glucose control of diabetes. Hemoglobin variants (Hemoglobinopathies) present in certain ethnic groups may interfere with the analysis leading to erroneously low or high results especially with immunological methods.</p> <p>Trueness (bias) was evaluated by comparing the gained results with ERLGH-value assigned samples from Labquality's Proficiency testing round for Hemoglobin A1c. Precision and repeatability were tested by analyzing control samples for 10 days. In addition, carryover and the effect of different individuals performing the pretreatment process were studied. Linearity was tested with Linearity Set series. Hemolysate storability was tested at room temperature and fridge. A five-day assay comparison consisted of analyzing 100 samples from four different nationalities (Finnish, Russian, Somali and Kurdish). An estimate of measurement uncertainty for the new method was calculated at the end.</p> <p>Based on the validation, repeatability and accuracy of the enzymatic method are well within the accepted limits and the assay is linear across the measuring interval. Results obtained with the new method are statistically significantly lower but the linear correlation between all methods was good. There were a few individual "outlier" results possibly due to hemoglobinopathy or some other interference. Specimens should not be diluted since that can affect the calculated ratio. No sign of carryover was detected and hemolysate storability was good. An estimate of measurement uncertainty was lower for the new method (~8 %). The method meets the specifications and fulfills its intended purpose.</p>	
Keywords	HbA _{1c} , validation, enzymatic method, diabetes

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoreettinen tausta	2
2.1	Diabetes (<i>diabetes mellitus</i>)	2
2.1.1	Esiintyvyys ja ilmaantuvuus	2
2.1.2	Alaryhmät	3
2.1.3	Diagnostiikka	5
2.2	Hemoglobiini	5
2.2.1	Hemoglobiinimolekyylin rakenne	5
2.2.2	Hemoglobinopatiat, talassemiat ja hemoglobiinijohdannaiset	6
2.2.3	Glykoitunut hemoglobiini (GHb)	10
2.3	HbA _{1c} -mittaukset	12
2.3.1	Yleisimmät mittausmenetelmät	12
2.3.2	HbA _{1c} -mittausten historia	14
2.3.3	GHb-standardisaatio, HbA _{1c} -yksikkö ja viitearvot	15
2.3.4	Mittausta häiritsevät tekijät	18
2.3.5	Laadunarviointi	23
3	Validoinnissa käytetyt menetelmät	25
3.1	Architect c8200 -analysaattori	25
3.2	Vanha immunoturbidimetrinen Architect c8000 HbA _{1c} -menetelmä	26
3.2.1	Menetelmän periaate	26
3.2.2	Menetelmän rajoitukset	27
3.3	Uusi entsymaattinen Architect c8000 HbA _{1c} -menetelmä	28
3.3.1	Menetelmän periaate	28
3.3.2	Menetelmän rajoitukset	29
3.3.3	Näytteiden säilyvyys	29
3.3.4	Spesifinen suorituskyky	30
3.4	Validointisuunnitelma	31

4	Validointityö ja tulokset	33
4.1	Reagenssit ja välineet	33
4.2	Näytteiden käsittely	34
4.3	Kalibrointi	35
4.4	Toistettavuus	37
4.4.1	Esi-toistotarkkuus	37
4.4.2	Yksilöllisen kädenjäljen vaikutus	38
4.4.3	Sisäinen uusittavuus	39
4.4.4	Siirtymävirhe	41
4.5	Oikeellisuus	42
4.6	Näytteiden laimentaminen	46
4.7	Lineaarisuus	47
4.8	Menetelmävertailu	49
4.9	Säilyvyys	56
4.10	Mittausepävarmuus	58
5	Yhteenveto	59
	Lähteet	63
	Liitteet	
	Liite 1. Validointisuunnitelma	
	Liite 2. Kalibrointisuorat	

Lyhenteet

ADA	<i>American Diabetes Association.</i> Amerikkalainen diabetesliitto.
ADAG	<i>A1c-derived average glucose.</i> A1c:stä johdettu plasman keskimääräinen glukoosipitoisuus.
CE	<i>Capillary electrophoresis.</i> Kapillaarielektroforeesi.
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial.</i> Diabeteksen seurantatutkimus.
DEHKO	Diabeteksen ehkäisyn ja hoidon kehittämisohjelma eli Suomen kansallinen diabetesohjelma.
eAG	<i>Estimated Average Glucose.</i> Arvioitu keskimääräinen glukoosipitoisuus.
ePG	<i>Estimated Plasma Glucose.</i> Plasman arvioitu keskimääräinen glukoosipitoisuus.
ERLGH	<i>European Reference Laboratory for Glycohemoglobin.</i> Eurooppalainen glykohemoglobiinimäärittysten referenssilaboratorio.
ESI-MS	<i>Electrospray ionisation mass spectrometry.</i> Sähkösumutusmassaspektrometria.
GHb	<i>Glycohemoglobin.</i> Glykohemoglobiini, glykoitunut hemoglobiini.
GSA	<i>Glycated serum albumin.</i> Seerumin glykoitunut albumiini.
GSP	<i>Glycated serum proteins.</i> Seerumin glykoituneet proteiinit.
HPFH	<i>Hereditary persistence of fetal hemoglobin.</i> Perinnöllinen tila, jossa fetaalihemoglobiini (HbF) on pysyvästi koholla.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography.</i> Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

IEF	<i>Isoelectric focusing.</i> Isoelektrinen fokusointi.
IFCC	<i>International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.</i> Kansainvälinen kliinisen kemian ja laboratoriolääketieteen järjestö.
IFG	<i>Impaired fasting glucose.</i> Kohonnut paastosokeri.
IGT	<i>Impaired glucose tolerance.</i> Heikentynyt sokerinsieto.
NGSP	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program.</i> Glykohemoglobiinin kansallinen standardisaatio-ohjelma.
OGTT	<i>Oral glucose tolerance test.</i> Glukoosirasituskoe.
SKKY	Suomen kliinisen kemian yhdistys.
THb	<i>Total hemoglobin.</i> Kokonaishemoglobiini.
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study.</i> Diabetes-seurantatutkimus.

1 Johdanto

Tämän Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) Tautiriskiyksikön analyttisen biokemian laboratoriossa tehtävän opinnäytetyön tavoitteena on validoida uusi HbA_{1c}-analysointimenetelmä, jota käytetään diabetekseen liittyvissä tutkimuksissa. Laboratoriossa tähän asti käytössä ollut immunoturbidimetrinen Abbott Architect c8000 MULTI-GENT HbA_{1c} -menetelmä on poistumassa markkinoilta, ja tilalle on jatkossa tulossa entsymaattinen Abbott Architect c8000 HbA_{1c} -menetelmä. Menetelmät ovat mittausperiaatteiltaan erilaiset, ja uuden menetelmän toivotaan pienemmän häiriöherkkyytensä ansiosta tuottavan entistä tarkempia mittaustuloksia. Immunologisten menetelmien ongelmana on ollut se, että niissä käytetyt vasta-aineet eivät ole kyenneet tunnistamaan erilaisia hemoglobiinivariantteja. Tämä voi johtaa joko virheellisen korkeisiin tai mataliin HbA_{1c}-tuloksiin. [1; 2.] Uusi entsymaattinen menetelmä perustuu HbA_{1c}:n β -ketjun N-terminaalisten fruktosyylidipeptidien spesifiseen mittaukseen [3].

Diabetes on ryhmä hiilihydraattiaineenvaihdunnan häiriöitä, joihin liittyy pitkäaikaisesti kohonnut verensokeri [4, s. 100]. Suomessa diabetesta sairastaa arvioiden mukaan jo yli 500 000 ihmistä ja ennusteen mukaan tautiin sairastuvien määrä on maailmanlaajuisestikin jatkuvasti kasvussa. Erityisesti tyypin 2 diabetes on yleistymässä ja muuttumassa myös yhä nuorempien sairaudeksi. [5, s. 2–4.] HbA_{1c}-menetelmää käytetään kliinisissä laboratorioissa hemoglobiini A_{1c}:n prosentuaalisen tai mmol/mol-osuuden kvantitatiiviseen *in vitro* -määrittelyyn ihmisperäisistä kokoverinäytteistä [3]. HbA_{1c}-pitoisuuden on havaittu vaihtelevan laajasti suhteessa diabeettiseen hoitotasapainoon. Terveisiin yksilöihin verrattuna diabeetikoiden HbA_{1c}-osuus kokonaishemoglobiinista on huomattavasti korkeampi. [6, s. 842–843.] HbA_{1c}-määrittelyä käytetäänkin apuna diabeteksen diagnosoinnissa, diabetes-riskipotilaiden tunnistamisessa ja jo todettujen diabetespotilaiden pitkäaikaisen sokeritasapainon seurannassa [1; 3; 7, s. 395].

HbA_{1c} on normaalin hemoglobiini A:n (HbA) osa, joka on ensin palautuvasti ja sitten peruuttamattomasti glykoitunut yhdestä tai molemmista hemoglobiinin β -ketjun N-terminaalisista valiini-aminohapoista [1; 3; 7, s. 395]. Mitä kauemmin punasolut ovat verenkierrossa ja mitä korkeampi on niitä ympäröivän plasman glukoosin taso, sitä korkeampi on myös verestä mitattu HbA_{1c}-pitoisuus. Punasolun keskimääräinen elinikä on noin 120 vuorokautta. Koska glykoituminen jatkuu koko punasolun eliniän ajan, on HbA_{1c} hyvä merkkiaine mittausta edeltäneestä noin kolmen kuukauden keskimääräi-

sestä veren glukoosipitoisuudesta. [8, s. 450–451; 9, s. 24; 10, s. 25.] Mikä tahansa punasolun elinikää laskeva syy lyhentää myös glukoosille altistumisaikaa ja siten vastaavasti alentaa HbA_{1c}-arvoja [6, s. 846].

Uusi entsyymaattinen HbA_{1c}-menetelmä on tarkoitus validoida ja ottaa käyttöön ennen syksyllä 2013 käynnistyvän kansainvälisen diabetestutkimuksen HbA_{1c}-näytteiden analysoinnin aloittamista. Validoinnin tarkoituksena on varmistaa, että uusi menetelmä on käyttötarkoitukseensa soveltuva ja sen antamat tulokset ovat tarkkoja, luotettavia ja toistettavia. Menetelmä koostuu kahdesta eri sovelluksesta, automaattisesta kokoveri- ja manuaalisesta hemolysaattisovelluksesta. Kokoverisovelluksessa näytteet voidaan syöttää sellaisenaan Architect kliinisen kemian c8000 -analysaattorille. Manuaalisessa sovelluksessa näytteet esikäsitellään ennen analysointia valmistamalla näytteistä niin kutsutut hemolysaatit.

Menetelmävertailussa uutta kokoverisovellusta ja manuaalista hemolysaattisovellusta verrataan laboratoriossa rutiinikäytössä olleeseen immunoturbidimetrisen HbA_{1c}-menetelmään. Validoinnissa tutkitaan uuden menetelmän tarkkuutta (toistettavuus ja oikeellisuus), hemolysaattinäytteiden säilyvyyttä, menetelmän lineaarisuutta sekä laskeaan menetelmälle mittausepävarmuusarvio. Lisäksi tutkitaan, onko uuden ja vanhan menetelmän välillä suurempi ero analysoidessa jonkin tietyn kansallisuusryhmän verinäytteitä, joissa erityisesti immunologista mittausta häiritsevän rakenteellisesti poikkeavan hemoglobiinin (hemoglobinopatia) esiintymistodennäköisyys on suurempi. Näytteitä analysoidaan neljästä eri kansallisuusryhmästä: suomalaiset, venäläiset, somalit ja kurdit.

2 Teoreettinen tausta

2.1 Diabetes (*diabetes mellitus*)

2.1.1 Esiintyvyys ja ilmaantuvuus

WHO:n (World Health Organization) arvion mukaan diabeteksen esiintyvyys yli 25-vuotiailla vuonna 2008 oli noin 10 % [11, s. 16] ja tällä hetkellä yhteensä 347 miljoonaa ihmistä maailmassa sairastaa diabetesta [12]. Ennusteen mukaan sairastuvien määrä on maailmanlaajuisesti jatkuvasti kasvussa [5, s. 2], ja vuonna 2030 diabeteksen usko-

taan olevan jo 7. yleisin kuolinsyy [12]. Eurooppalaisella tasolla aikuisia diabeetikkoja on 55 miljoonaa ja määrän arvioidaan nousevan 66 miljoonaan vuoteen 2030 mennessä [13]. Erityisesti tyypin 2 diabetes on yleistymässä ja muuttumassa myös yhä nuorempien sairaudeksi [5, s. 2]. Suomessa diagnosoituja diabeetikoita on noin 300 000, mutta arviolta 200 000 ihmistä sairastaa tyypin 2 diabetesta tietämättään. Yhä useammalla suomalaisella on diabeteksen esiaste, kuten IGT (impaired glucose tolerance) eli heikentynyt sokerinsieto tai IFG (impaired fasting glucose) eli kohonnut paastosokeri. Diabeteksen ilmaantuvuus on kasvanut nopeimmin keski-ikäisten (30–40-vuotiaiden) suomalaisten ikäryhmässä. [13.]

Diabetes voi ajan myötä vaurioittaa sydäntä, verisuonia, silmiä, munuaisia ja hermoja. Terveellinen ruokavalio, normaalipaino, säännöllinen fyysinen liikunta ja tupakan välttäminen voivat estää ja hidastaa tyypin 2 diabeteksen puhkeamista. [12.] Diabeteksen ehkäisyn ja hoidon kehittämisohjelman (Dehko) ja Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) yhteishankkeena toteutetusta FinDM II -tutkimusrekisteristä on selvitetty diabeteksen ja sen lisäsairauksien esiintyvyyttä ja ilmaantuvuutta Suomessa vuosina 1997–2007. Tästä rekisteristä löydettiin 637 585 potentiaalista diabeetikkoa. Rekisterin diabeetikot on luokiteltu insuliiniriippuvaisiin, ei-insuliiniriippuvaisiin sekä raskausdiabeetikoihin. Diabeetikoiden kokonaismäärä Suomessa lisääntyi tutkimuksen seuranta-aikana 65 %, ja myös diabeteksen ilmaantuvuus kasvoi tänä aikana. Positiivisena uutisena voidaan kuitenkin pitää sitä, että lisäsairaudet, kuten ensimmäiset sydän- ja aivoinfarktit sekä raajojen amputaatiot, vähenivät tutkimusaikana suhteellisesti. Tämä johtui mahdollisesti diabeteksen varhaisesta diagnosoinnista, hoidon kehittymisestä tai valtimotautiriskien arvioinnin tehostumisesta. [14, s. 7–11.]

2.1.2 Alaryhmät

Diabetes on ryhmä hiilihydraattiaineenvaihdunnan häiriöitä, joihin liittyy plasman kroonisesti suurentunut glukoosipitoisuus eli pitkäaikaisesti kohonnut verensokeri. Hyperglykemia, eli elimistön epänormaalin korkea veren glukoosipitoisuus, voi aiheutua insuliinin puutteesta ja/tai insuliinin heikentyneestä vaikutuksesta eli insuliiniresistenssistä. [4, s. 100; 5, s. 2–4.] Taudinkuvaan voi liittyä äkillisiä ja kroonisia komplikaatioita. Diabetes jaotellaan yleensä tyypin 1 ja tyypin 2 muotoihin, mutta näiden päätyyppien lisäksi on olemassa useita muitakin taudinkuvaan tai etiologiaan eli taudin syihin perustuvia alaryhmiä. Etiologisiin alaryhmiin luokittelu voi olla hyvin subjektiivista eikä aina mah-

dollistakaan, sillä potilailla voi olla piirteitä useammasta alaryhmästä. Tällöin voidaan käyttää diagnoosia ”epävarma diabetestyyppi”. [5, s. 2–4.]

Noin 10–15 % Suomessa todetuista diabetestapauksista on tyypin 1 eli nuoruustyyppin diabetestapauksia (T1D, DM1). Sairaus voi hoitamattomana johtaa happomyrkytykseen (ketoasidoosi), koomaan tai jopa kuolemaan. Sen puhkeamiseen vaikuttavat sekä perinnölliset että ympäristötekijät, ja sitä luonnehtii selkeä insuliininpuute. Tyypin 1 diabeteksessa haiman insuliinia tuottavat Langerhansin saarekkeiden beetasolut tuhoutuvat elimistön oman immuunijärjestelmän virheestä johtuvassa autoimmuuniprosessissa. Suomessa esiintyy suhteellisesti eniten tyypin 1 diabetesta koko maailmassa ja esiintyvyys on edelleen nousussa. Kasvun taustalla on ilmeisesti toistaiseksi tunnetun ympäristötekijä, josta seuraa geneettisesti alttiiden suomalaisten sairastuminen. [5, s. 3–5.]

Tyypin 2 eli aikuistyyppin diabetes (T2D, DM2) on Suomessa selkeästi yleisin diabetes-tyyppi. Vaikka sairaus on pitkälti alidiagnosoitu, on sen osuus peräti noin 75 % kaikista diagnosoiduista tapauksista. Tyypin 2 diabetes on heterogeeninen sairausryhmä. Sairaus puhkeaa yleensä vasta aikuisiällä ja siihen liittyy myös ylipainoa, kohonnuttua verenpainetta tai rasva-aineenvaihdunnan häiriöitä (dyslipidemia) tai molempia (metabolinen oireyhtymä). Myös tyypin 2 diabeteksen taustalla vaikuttavat perimän lisäksi elintapa- ja ympäristötekijät. Koska taudissa yhdistyvät sekä insuliininpuute että insuliiniresistenssi, on elimistön insuliinintuotanto tarpeeseen suhteutettuna liian matalaa. [5, s. 3–5.]

Kahden päädiabetestyyppin lisäksi muita alaryhmiä ovat LADA (latent autoimmune diabetes in adults), MODY (maturity-onset diabetes in the young), sekundaaridiabetes, raskausdiabetes, mitokondriaalinen diabetes (MIDD = mitochondrial diabetes with deafness) ja neonataalidiabetes (NDM). LADA muistuttaa tyypin 2 diabetesta, mutta siinä insuliininpuute kehittyy yleensä nopeammin. Sairaus puhkeaa 35 ikävuoden jälkeen ja se voidaan diagnosoida verestä löytyvien GAD (glutamaattidekarboksylaasi) -vasta-aineiden perusteella. LADA:n osuus yli 35-vuotiailla todetuista diabetestapauksista Suomessa on noin 10 %. MODY:n osuus kaikista diabetestapauksista on alle 5 %. MODY-diagnoosi varmistetaan DNA-testillä, sillä sen taustalta löytyy mutaatio ainakin kuudessa eri geenissä. Sairaus puhkeaa tyypillisesti ennen 25 ikävuotta, GAD-vasta-aineita ei löydy ja sairaus kulkee suvussa, jossa myös raskausdiabetes on yleinen. [5, s. 3–4.]

Diabetes voi puhjeta myös jonkin muun sairauden tai insuliiniherkkyyteen tai -eritykseen vaikuttavan tilan (esim. haimatulehdus, haimanpoisto) seurauksena. Tällöin puhutaan sekundaaridiabeteksesta. Raskausdiabetes puolestaan todetaan nimensä mukaisesti ensimmäistä kertaa raskauden aikana. Tauti voi hävitä raskauden päätyttyä, mutta puhjeta myöhemmin uudestaan. Raskausdiabeteksessa plasman glukoosikriteerit ovat erilaiset kuin muussa diabetesdiagnoosiikassa. DNA-testillä diagnosoitava mitokondriaalinen diabetes, johon liittyy usein kuulohäiriö tai neurologisia oireita, periytyy vain äidiltä ja aiheutuu mutaatiosta mitokondriaalisessa DNA:ssa. Geenivirheen aiheuttama neonataalidiabetes (NDM) todetaan ensimmäisten elinkuukausien aikana ja tila voi olla joko pysyvä tai ohimenevä. [5, s. 4.]

2.1.3 Diagnostiikka

Diabetes-diagnostiikka on kehittynyt vuosien saatossa. Aluksi sairausepäilyt perustui pitkälti vain oireisiin, kuten väsymykseen, janoon ja runsaaseen virtsaneritykseen (polyuria). Sitten ruvettiin määrittämään virtsasta pelkistäviä yhdisteitä tai sokereita ja myöhemmin glukoosia. Nykyisin virtsan glukoosimääryityksiä pidetään munuaisten toimintahäiriöissä epäluotettavina. Merkittävimpiä menetelmiä ovatkin kokoveren, tai lähinnä plasman, glukoosin akuutti määrittäminen pikakokeena, paastonäytteenä tai oraalisena toimintakokeena ("sokerirasituskoe"). Glukoositesteissä käytetään hyväksi entsymaattista määrittämenetelmää ja spesifisiä glukoosidehydrogenaasi-, heksokinaasi- tai glukoosioksidaasireaktioita. Veren pitkäaikaisen sokeritasapainon seuranta glykoitunutta hemoglobiinia (HbA_{1c}) määrittämällä aloitettiin 1960-luvun lopussa. [4, s. 100.]

2.2 Hemoglobiini

2.2.1 Hemoglobiinimolekyylin rakenne

Hemoglobiini on punasolujen eli erytrosyyttien happea kuljettava pigmentti, jota muodostuu solujen kehittyessä luuytimessä. Valmiilla hemoglobiinituotteella on rajattu elinikä, minkä jälkeen se hajoaa (bilirubiini) ja poistetaan elimistöstä. Ihmisen hemoglobiini on konjugoitu, pallomainen, halkaisijaltaan 6,4 nm oleva, 64 500 Da:n painoinen hemoproteiini. Sen toiminnallinen yksikkö on tetrameeri, joka koostuu neljästä alayksiköstä (monomeeri). Monomeerit ovat polypeptidiketjuja (globiinit), joita on kaksi paria (α ja β /"ei- α "). [15, s. 509–510; 16, s. 8.] Jokaisessa monomeerissä on yksi hemiryhmä, joka

sijaitsee ketjun hydrofobisessa taskussa [17, s. 224]. Happi sitoutuu monomeerin rautaa sisältävään hemiosaan [16, s. 8]. Hemirauta on yleensä ferromuodossa (Fe^{2+}) ja toimii pääasiallisena happea kuljettavana yksikkönä [15, s. 510–511]. Rakenteeltaan hemoglobiini on allosterinen proteiini, jonka avaruusrakenne vaihtelee kahden äärimuodon välillä. Ligandin, kuten happimolekyylin, sitoutuessa tai vapautuessa avaruusrakenne muuttuu. [16, s. 8.]

Hemoglobiinin globiiniketjujen aminohappokoostumus vaihtelee. Vaihtelun perusteella ketjuja nimitetään joko alfa (α) -, beeta (β) -, gamma ($^G\gamma$, $^A\gamma$) -, delta (δ) -, epsilon (ϵ) - tai zeta (ζ) -ketjuiksi. Näistä α ja ζ ovat α -tyypin globiiniketjuja, jotka aikuisilla koostuvat 141 aminohaposta. Loput ovat β -tyyppisiä, 146 aminohappoa sisältäviä ketjuja. Hemoglobiinikoostumus vaihtelee yksilön eri kehitysvaiheissa. Alkio- ja sikiökaudella syntetisoituu hapensitomiskyvyltään tehokkaampaa hemoglobiinia kuin aikuisiässä. Alkiokautisia hemoglobiineja ovat Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$) -, Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) - ja Portland ($\zeta_2\gamma_2$) - hemoglobiinit. Varsinainen sikiökaautinen fetaalihemoglobiini on HbF ($\alpha_2^G\gamma_2$ ja $\alpha_2^A\gamma_2$). [16, s. 8.] HbF:llä on samanlainen α -ketju kuin normaalilla hemoglobiinimuodolla, mutta sen toista ketjua kutsutaan γ -ketjuksi. Tämä ketju omaa β -ketjun kanssa saman aminohappotähdemäärän ja on rakenteeltaankin hyvin homologinen. [15, s. 510.]

Sikiöaikana alkaa syntetisoida myös jo normaalia aikuisiän hemoglobiinia HbA:ta ($\alpha_2\beta_2$). HbA₂-muodolla ($\alpha_2\delta_2$) on tavallinen α -ketju, mutta toinen globiiniketju on δ -ketju. Syntyessään ihmisellä on noin 70–80 % HbF:ää ja loput HbA:ta. Normaaleilla aikuisilla yksilöillä HbA muodostaa (lähteestä riippuen) kokonaishemoglobiinista 85–95 % (96–98 %), HbF < 1 % (0,5–2 %) ja HbA₂ < 3,5 % (2–3 %). [1, s. 155; 15, s. 510; 16, s. 9.]

Hemoglobiinisynteesi voi häiriintyä muun muassa raaka-aineiden puutteesta (esim. raudanpuute), synteesimekanismin kontrolloimattomuudesta, valmiin tuotteen liiallisesta hävikistä tai muuntumisesta kuona-aineeksi tai jos kuona-aine ei jostain syystä eliminoidu tehokkaasti elimistöstä. Häiriöt ilmentyvät seuraavissa kliinisissä tiloissa, kuten hemoglobinopatia, talassemia, raudanpuuteanemia, maksasairaudet ja useat geneettiset taudit (Crigler-Najjar, Gilbertin syndrooma). [15, s. 510.]

2.2.2 Hemoglobinopatiat, talassemiat ja hemoglobiinijohdannaiset

Geneettistä alkuperää olevat periytyvät talassemiat ja hemoglobinopatiat ovat hemoglobiinin globiiniketjujen tuotantoon ja rakenteeseen vaikuttavia kliinisiä häiriötiloja,

joiden esiintyminen vaihtelee maantieteellisesti ja rodullisesti. Hemoglobinopatiat ovat globiinigeenien mutaatioista syntyviä rakenteellisesti epänormaaleja hemoglobiineja eli variantteja. Mutaatiot muuttavat normaalien aminohappotähteiden sekvenssejä yhdessä tai useammassa globiiniketjussa. [15, s. 511–514; 17, s. 224.] Suurin osa aiheutuu pistemutaatiosta eli yhden nukleotidin vaihtumisesta toiseen α -, β -, δ - tai γ -ketjuja koodaavissa geeneissä [1, s. 153; 16, s. 8], valtaosa tunnetuista tapauksista on β -ketjun muunnoksia [17, s. 233].

Erilaisia hemoglobinopatioita on kuvattu jo yli 1000 kpl. Hemoglobinopatioita on nimetty esimerkiksi kirjainten (S, C, D, E) tai maantieteellisten löytöpaikkojen tai indeksitapausten sukunimien mukaan. [15, s. 514.] Internetistä löytyy ajan tasalla oleva maailmanlaajuinen tietokanta (<http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/>) eri hemoglobiinivarianteista ja talassemioista. Tietokannan mukaan tähän mennessä (13.9.2013) on löydetty jo 1170 erilaista hemoglobiinivarianttia. [18.]

Useita miljoonia ihmisiä koskettavia, niin kutsuttuja suuria hemoglobinopatioita, ovat HbS, HbC, HbD Punjab ja HbE. Nämä voivat esiintyä sekä hetero- että homotsygoottimuodossa. Harvoin oireita aiheuttavat heterotsygoottiset punasolut sisältävät sekä normaalia HbA:ta että poikkeavaa hemoglobiinia. Tällaisista käytetään nimitystä ”trait” eli poikkeava piirre. Tunnetuin esimerkki poikkeavasta piirteestä on heterotsygoottinen HbS eli sirppisoluhemoglobiini (sickle cell trait). Homotsygooteilta normaali HbA puuttuu kokonaan, mikä voi aiheuttaa vaihtelevia kliinisiä ilmenemismuotoja. [17, s. 234.] Sirppisoluanemia johtuu yleensä HbS/HbS-homotsygotiasta (HbSS), jolloin kummaltakin vanhemmalta periytyy sama β -globiinigeenin pistemutaatio [16, s. 9].

Suurimman hemoglobinopatiaryhmän muodostavat hemoglobiinit, joiden happiaffiniteetti on lisääntynyt tai jotka ovat epästabiileja [17, s. 233]. Normaali hyvän hapenkuljetuskyvyn omaava hemoglobiini on liukoinen ja stabiili [19]. Epästabiilit hemoglobiinit hajoavat helpommin, mikä voi johtaa punasolujen kiihtyneeseen tuhoutumiseen eli hemolyyttiseen anemiaan [16, s. 9]. Varianttien esiintyvyys diabeetikoiden keskuudessa vaihtelee eri puolella maailmaa [1, s. 153–161; 2, s. 135–136].

Yleisin variantti HbS syntyy β -ketjun glutamiinin korvautuessa valiinilla. HbS-tyyppiä esiintyy laajasti Afrikan itärannikolla ja päiväntasaajan alueella sekä pienillä alueilla Turkissa ja Kreikassa. Joissakin Kreikan kylissä HbS-vallitsevuus on 32 %, Etelä-Turkissa 25 % ja USA:n mustaihoisilla noin 8 %. [17, s. 224, 234.] HbC:tä esiintyy eri-

tyisesti Länsi-Afrikassa, ja osissa Saharan eteläpuolista Afrikkaa esiintyvyys voi olla jopa 30 % [1, s. 159]. USA:n mustaihoisilla tavataan HbC:n heterotsygoottista muotoa 2–3 %:lla, homotsygoottista noin 0,2 %:lla. HbSC on sirppiytymistauti, jossa toiselta vanhemmalta on periytynyt HbS- ja toiselta HbC-geeni. Tauti muistuttaa homotsygoottisen HbS:n aiheuttamaa sirppisoluanemiasia (HbSS), mutta on oireiltaan lievempi. [17, s. 237.]

HbE on toiseksi yleisin hemoglobiinipoikkeavuus maailmassa. HbE:tä tavataan tyypillisimmin Kaakkois-Aasiassa, varsinkin Thaimaassa ja Vietnamsissa. [1, s. 161; 17, s. 237.] Fetaalihemoglobiini HbF:n suhteellinen osuus on syntyessä noin 70 %, mutta määrä laskee nopeasti HbA-synteesin käynnistyttyä. Kuuden kuukauden iässä HbF:n osuus on jo < 5 %. Aikuisena HbF:n osuus hemoglobiinista on vain noin 0,5–2 %. [1, s. 154–161; 15, s. 510; 17, s. 224.] Tunnetaan kuitenkin myös perinnöllinen tila HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin), jossa HbF on pysyvästi koholla, koska β -globiinin synteesi on vähentynyt ja γ -globiinin synteesi vastaavasti lisääntynyt [15, s. 514]. HbD Punjab on yleisin Intiassa Punjabin osavaltiossa, missä sen vallitsevuus sikeillä on 2 % [17, s. 237].

Tilastokeskuksen ennakkotietojen mukaan Suomen väkiluku oli elokuun 2013 lopussa 5 442 322 ja suurin syy väestönkasvuun oli muuttovoitto ulkomailta [20]. Suomessa vakituisesti asuvien ulkomaalaisten osuus on 3,6 % väestöstä ja määrä on viimeisen kymmenen vuoden ajan ollut jatkuvasti nousussa. Vuonna 2012 ulkomaalaisia asui Suomessa 195 511. Määrä ei pidä sisällään Suomen kansalaisuuden saaneita eikä turvapaikanhakijoita. Äidinkielen mukaan jaoteltuna suurimpia vieraskielisiä väestöryhmiä olivat venäjä, eesti (viro), somali, englanti, arabia, kurdi, kiina, albania, thai ja vietnam. Yhteensä vieraskielisiä oli 266 949 eli 4,9 % väestöstä. [21, s. 3–5.] Osassa Suomea kansainvälisen väestön osuus on jo huomattava, esimerkiksi pääkaupunkiseudulla joka kymmenes asukas on maahanmuuttajataustainen [22]. Suurimmat maahanmuuttajaryhmät, joilla esiintyy hemoglobiinin poikkeavuutta, ovat somalit, vietnamlaiset, kiinalaiset, kurdit ja entisen Jugoslavian alueelta tulevat ihmiset. Suomeen saapuneilta maahanmuuttajilta on tavattu lähinnä HbS- ja HbE-variantteja, yleisin hemoglobiinipoikkeavuus tähän mennessä on ollut beetatalassemia. [19.]

Suomalaisten omasta etnisestä taustasta on löydetty viisi varianttityyppiä: Hb Helsinki, Hb Meilahti (tunnetaan myös nimellä Hb Linköping tai Hb Finlandia), Hb Vaasa, Hb Tacoma ja Hb Hijiya [18]. Ensimmäisenä suomalaisena varianttina löydettiin kohon-

neen happiaffiniteetin omaava heterotsygoottinen Hb Helsinki, jota tavataan suhteellisen runsaasti varsinkin rannikkoseudulla. Myöhemmin on tunnistettu tätäkin yleisempi β -ketjuvariantti, Hb Meilahti, jota tavataan koko Suomessa. Suomen etelärannikolla harvinaisina on tavattu muualla maailmassa aiemmin esiintynyttä α -ketjuvarianttia Hb Cemenelum ja β -ketjuvariantteja Hb Malmö, Hb Syracuse ja Hb Johnstown. Epästabiili β -ketjuvariantti Hb Vaasa on suhteellisen yleinen koko Suomessa ja sitä on tavattu sekä homo- että heterotsygoottisena. Toistaiseksi karakterisoimatta on kaksi varianttia, HbX_{Pori} ja HbX_{Tampere}. Viime vuosina Suomessa on havaittu myös esimerkiksi Hb Titusville ja Hb Broussais. [16, s. 10–13.]

Talassemiat johtuvat globiiniketjujen riittämättömästä tuotannosta. Talassemioita luokitellaan sen mukaan, minkä globiiniketjun puutosta ne aiheuttavat (α -talassemia, β -talassemia, $\delta\beta$ -talassemia). [15, s. 511–514.] Talassemiat ovat maapallon yleisin periytyvä tautiryhmä, jota sairastaa noin 200 miljoonaa ihmistä. Alfatalassemiaa esiintyy eniten Kaakkois-Aasiassa ja Länsi-Afrikassa, beetatalassemiaa puolestaan löytyy laajalta vyöhykkeeltä Välimeren ympäristöä sekä Arabian niemimaan ja Intian ylitse Kaakkois-Aasiaan ulottuvalta alueelta. [17, s. 224–226.]

Monien homotsygoottisten hemoglobiinopatioiden (HbSS, HbCC ja HbSC) ja beetatalassemian yhteydessä verestä löytyy usein myös lisääntyneitä määriä harvinaisempia Hb-lajeja, kuten HbA₂:ta ja HbF:ää. Sirppisolu- ja beetatalassemiapotilaiden HbF-osuus vaihtelee 2–20 %:n välillä. HbF-osuudet voivat nousta hieman myös raskauden aikana, vaikeissa anemioissa ja tietyissä leukemioissa. [1, s. 154–161; 17, s. 237.]

Karbamyloitu hemoglobiini on yleisimmin tavattu kemiallisesti modifioitunut hemoglobiinijohdannainen. Urean hajoamisen seurauksena syntyy isosyaanihappoa, jonka kanssa hemoglobiinin β -ketjun N-terminaalinen valiini mielellään reagoi, jolloin muodostuu stabiilia karbamyloitua hemoglobiinia. [1, s. 159.] Karbamyloitumista tapahtuu normaalistikin, mutta huomattavasti suuremmassa määrin munuaisten vajaatoiminnan yhteydessä ja seerumin ureatason ollessa kohonnut [23, s. 83]. Jokaista 1 mmol/l seerumin ureaa kohti muodostuu kokonaishemoglobiiniin suhteutettuna 0,063 % lisää karbamyloitua hemoglobiinia [24, s. 138]. Ureemisilla potilailla jopa 3 % hemoglobiinista voi olla karbamyloitua. Tämän lisäksi potilaiden punasolujen elinikä on normaalia lyhyempi. Toinen yleinen hemoglobiinijohdannainen, asetyloitu hemoglobiini, voi syntyä lääkkehoidon seurauksena (aspiriini) tai harvinaisesta mutaatiosta β -globiiniketjun N-

terminuksessa. N-terminuksen asetylaatio estää hemoglobiinin glykoitumista tähän asemaan. [1, s. 154–159.]

2.2.3 Glykoitunut hemoglobiini (GHb)

Glykoitumattomia, ”natiiveja” hemoglobiinityyppejä ovat HbA (HbA₀), HbA₂ ja HbF. Glykoituneita hemoglobiineja on monenlaisia, mutta kaikissa niissä on hiilihydraattiosa (glukoosi tai johdannainen) kiinnittyneenä yhteen globiiniketjuista. [6, s. 841–842.] Hemoglobiinin ”ei-entsymaattisesta glukoositähteiden lisäysreaktiosta syntyvään modifiointiin” on kirjallisuudessa viitattu useilla eri termeillä, kuten glykoitunut hemoglobiini, glykohemoglobiini, GHb, HbA₁ tai HbA_{1c}. Nämä termit eivät kuitenkaan täysin vastaa toisiaan. Glykoituneet hemoglobiinit koostuvat HbA₁:stä ja muista hemoglobiini-glukoosi-addukteista. HbA₁ puolestaan pitää sisällään HbA_{1a}-, HbA_{1b}- ja HbA_{1c}-muodot. Muita hemoglobiini-glukoosi-addukteja ovat esimerkiksi glukoosi-lysiini- tai glukoosi- α -ketju-NH₂-terminaalinen valiini -adduktit. Suurin osa (noin 80 %) HbA₁:stä on HbA_{1c}-muotoa. [8, s. 450–451.] HbA_{1c}:n suhteellinen osuus hemoglobiinista on ei-diabeetikoilla noin 4 %. Muiden glykoituneiden hemoglobiinien suhteellinen osuus on alle 1 %. HbA_{1c}-muoto ei ole ainoastaan yleisempi kuin muut helposti erotettavat glykoituneet hemoglobiinit, vaan sen pitoisuuden on havaittu vaihtelevan laajasti suhteessa diabeteksen hoitotasapainoon. Diabeetikoilla HbA_{1c}:n suhteellinen osuus voi nousta 4 %:sta 20 %:iin. [6, s. 842–843.]

Glykoituneet hemoglobiinit syntyvät post-translationalisissa eli hemoglobiinisynteesin jälkeisissä muokkausreaktioissa [6, s. 842]. Glykaatio on spontaani, ei-entsymaattinen reaktio, jossa glukoosi kiinnittyy kovalenttisesti hemoglobiiniin [25, s. 384]. Kaksivaiheisessa reaktiossa glukoosin, tai muiden sokereiden, vapaa aldehydyryhmä liittyy ensin β -globiiniketjun N-terminaalisen valiinitähteen α -aminoryhmään, jolloin muodostuu labiili aldimiiniyhdiste eli niin kutsuttu Schiffin emäs. Tämä reaktiovaihe on vielä palautuva eli yhdiste voi purkautua takaisin natiiviksi hemoglobiiniksi ja glukoosiksi. Toisessa vaiheessa aldimiini-välivaiheen sisäisten uudelleenjärjestelyjen (Amadori-reaktio) seurauksena syntyy stabiili ketoamiinijohdos. [1, s. 154; 6, s. 842.]

HbA_{1c} on virallisen IFCC (International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) -määritelmän mukaan hemoglobiini, joka on peruuttamattomasti glykoitunut yhdestä tai molemmista β -ketjujen N-terminaalisista valiineista [1, s. 154]. Määritelmä ei sulje pois hemoglobiinia, joka on tämän lisäksi glykoitunut muistakin osista α -

tai β -ketjuja [25, s. 383; 26]. β -ketjun N-terminaalinen valiini on yleisin glykaatiokohta, 60–80 % HbA_{1c}:stä on glykoitunut juuri tästä asemasta [1, s. 154; 25, s. 384]. Tämä glykaatiokohta on tutkimuksenkin kannalta hyödyllisin, koska se muuttaa hemoglobiinin fysikaalisia ominaisuuksia, mitä voidaan edelleen hyödyntää eri mittausmenetelmissä. Glykoitumisen seurauksena hemoglobiinimolekyylin positiivinen nettovaraus pienenee [1, s. 154] ja kromatografinen liikkuvuus kasvaa, mistä juontaakin yhdisteiden kutsunanimi, ”nopeat hemoglobiinit” [6, s. 841–842].

Glykaatio alkaa punasolusynteesin (erytropoieesi) aikana ja jatkuu koko sen ajan, kun hemoglobiini on mukana verenkierrossa. Punasolujen elinikä on noin 120 päivää. [6, s. 842]. Koska glykoitumista tapahtuu koko punasolun eliniän ajan, mitä korkeampi ympäröivän plasman glukoosipitoisuus on, sitä suurempi osuus hemoglobiinista ennättää tänä aikana sokeristua [8, s. 451; 9, s. 24; 10, s. 25]. Mikä tahansa punasolun elinikää laskeva syy (esim. hemolyyttinen anemia), lyhentää myös glukoosille altistumisaikaa ja siten vastaavasti alentaa mitattuja HbA_{1c}-arvoja [6, s. 846].

Diabetespotilaiden veren glukoosimäärityksiä ei pidetä keskimääräisen glykemiatasoon kvantifioinnissa yhtä luotettavina kuin HbA_{1c}-mittauksia [8, s. 451]. Glykoitunut hemoglobiini ei ole samalla tavalla altis vaihtelulle kuin verensokerimittaukset, vaan sen avulla plasman glukoosiarvot saadaan integroitua pidemmältä aikaväliltä yhteen niin sanotuksi retrospektiiviseksi glykemiaindeksiksi [7, s. 395]. HbA_{1c} kuvastaa plasman keskimääräistä glukoositasoa mittausta edeltävän 2–3 kk:n aikana, mutta ei ole ajanjakson tarkka keskiarvo, vaan painottuu suhteessa enemmän viimeaikaiseen glykemiatasoon [9, s. 24; 25, s. 383; 27, s. 631]. HbA_{1c} (%) -arvon muuttuminen 1 %-lla vastaa suhteessa noin 2 mmol/l (35 mg/dl) muutosta plasman keskimääräisessä glukoosiarvossa [8, s. 453; 27, s. 631]. Seerumin/plasman glykoituneet proteiinit (fruktosamiinit) heijastavat myös glykemiaa, mutta huomattavasti lyhyemmältä aikaväliltä (15–30 vrk) kuin glykohemoglobiini (n. 120 vrk). Näiden proteiinien pitoisuuksien yhteydestä diabeteksen kroonisiin komplikaatioihin ei myöskään ole olemassa luotettavaa todistusaineistoa. [8, s. 451.]

2.3 HbA_{1c}-mittaukset

2.3.1 Yleisimmät mittausmenetelmät

GHb:n mittaamiseen on olemassa yli 30 erilaista menetelmää, jotka perustuvat hemoglobiinin erottamiseen glykoituneesta hemoglobiinista esimerkiksi varauseron, rakenne-erojen, kemiallisten analyysien tai massan avulla. Varauseroja hyödyntäviä tekniikoita ovat kationinvaihtokromatografia, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), elektroforeesi ja isoelektrinen fokusointi (IEF). Rakenne-eroja käytetään hyväksi affiniteetikromatografiassa ja immunomenetelmissä ja massaa massaspektrometriassa. Kemiallisia analyysejä käytetään fotometriassa ja spektrofotometriassa. [7, s. 395.]

Menetelmät vaihtelevat manuaalisista matalan suorituskyvyn menetelmistä pitkälti automatisoituihin suuria näytemääriä käsitteleviin menetelmiin [8, s. 451]. Menetelmän valintaan vaikuttavat muuan muassa näytetilavuus, potilaspopulaatio sekä hinta. Vanhemmat menetelmät kuten affiniteetikromatografia, elektroforeesi ja isoelektrinen fokusointi ovat pitkälti väistyneet erilaisten immunomenetelmien tai ioninvaihtokromatografian tieltä. [7, s. 395.] Päivittäisessä rutiinianalytiikassa immunologiset menetelmät ovat 2000-luvulta lähtien syrjäyttäneet nestekromatografiset menetelmät lähes täysin [4, s. 100]. GHb-arvot ilmoitetaan osuutena kokonaishemoglobiinista. Yleensä mitataan yhtä kolmesta pääasiallisesta GHb-tyypistä: HbA₁, HbA_{1c} tai totaali-GHb:ta. Suurin osa laboratorioista mittaa ja raportoi tulokset HbA_{1c}-muodossa. [7, s. 397.]

HPLC-menetelmissä HbA_{1c} ja muut hemoglobiinifraktiot erotetaan käyttäen yleensä kationinvaihtokolonnejä. Varauseroihin perustuvissa kationinvaihto-HPLC:ssä ja elektroforeesissa HbA_{1c} erottuu normaalista HbA:sta, koska N-terminaalisen valmiin glykaatio pienentää HbA:n positiivista varausta. [1, s. 154; 7, s. 396; 28, s. 153.] Lisäämällä puskurin ionivahvuutta hemoglobiinilajit eluoituvat eri retentioajoilla kationinvaihtokolonista. Fraktioiden absorbanssit mitataan spektrofotometrilla ja hemoglobiinikonsentraatio kvantifioidaan laskemalla kunkin piikin pinta-ala. HbA_{1c}:n %-osuus lasketaan seuraavalla yhtälöllä: $\% HbA_{1c} = 100 \times \frac{HbA_{1c}}{HbA + HbA_{1c}}$. Isoelektrinen fokusointi (IEF) puolestaan on analysointimenetelmä, jossa käytetään pH-gradienttigeeliä varaukseltaan erilaisten hemoglobiinilajien erottamiseen. [1, s. 155–157.]

Immunomenetelmissä tuotetaan vasta-aineita glukoosin Amadori-tuotetta sekä muutamaa ensimmäistä (4–8) β-ketjun N-terminaalista aminohappoa vastaan. Laajalti käy-

tössä oleva menetelmä mittaa HbA_{1c}:tä kokoverestä lateksiagglutinaatioinhibitiolla. Agglutinaattori eli synteettinen polymeeri, jossa on useita kopioita HbA_{1c}:n immunoreaktiivisesta osasta, kiinnittyy lateksin partikkeleihin sidottuun monoklonaaliseen anti-HbA_{1c}-vasta-aineeseen. Agglutinaatio (sakkautuminen) saa aikaan valon sirontaa, joka voidaan havaita kasvavana absorbanssina. Potilaan HbA_{1c} kilpailee lateksin vasta-aineesta estäen agglutinaatiota ja siten vähentäen valon sirontaa. Tarjolla on monoklonaalisia vasta-aineita käyttäviä kaupallisia entsyymi-immunomenetelmiä, joiden antamat tulokset korreloivat hyvin HPLC-tulosten kanssa. Vasta-aineet eivät tunnista hemoglobiinin labiileja välivaiheita tai muita glykoituneita hemoglobiineja (HbA_{1a} tai HbA_{1b}), koska vasta-aineiden sitoutumiseen tarvitaan sekä ketoamiini yhdessä glukosin kanssa että spesifiset aminohapposekvenssit. Samoin muut hemoglobiinivariantit, kuten HbF, HbA₂, HbS, ja karbamyloitu-Hb jäävät detektoimatta. [7, s. 396.] Immunomenetelmissä HbA_{1c}-% lasketaan suhteessa kokonaishemoglobiinipitoisuuteen [1, s. 161].

Affiniteetikromatografiassa käytetään affiniteettigeelikolonneja glykoituneen hemoglobiinin erottamiseen ei-glykoituneesta fraktiosta. Hemoglobiiniin sitoutuneen glukosin cis-diol-ryhmät reagoivat spesifisesti kolonnin m-aminofenyyliboorihappoon, jolloin glykoitunut hemoglobiini kiinnittyy kolonniin. Eluointi suoritetaan sorbitolilla. Kiinnittyneestä fraktiosta ja ei-kiinnittyneestä fraktiosta mitataan spektrofotometrisesti absorbanssit (415 nm) tai vaihtoehtoisesti suoritetaan fluoresenssimittaus. Tulosten avulla lasketaan GHb:n osuus. Boronaattiaffiniteetikromatografia määrittää kokonais-GHb:n sisältäen HbA_{1c}:n ja lysiineissä sekä α- että β-ketjujen N-terminaalisissa valiinitähteissä muodostuneet ketoamiinirakenteet. [1, s. 157; 7, s. 396.]

HPLC-ESI-MS (Electrospray Ionisation Mass Spectrometry) ja HPLC-CE (Capillary Electrophoresis) UV-detektiolla ovat IFCC:n HbA_{1c}:n standardisaatiotyöryhmän (Working Group on HbA_{1c} Standardization) kehittämiä spesifisiä referenssimenetelmiä. Menetelmän ensimmäisessä vaiheessa humaanit erytrosyytit eristetään, pestään ja hemolysoidaan. Toinen vaihe on hemoglobiinin entsymaattinen halkaisu. Koskematon hemoglobiinimolekyyli halkaistaan proteolyttisellä endoproteinaasi Glu-C:llä, jonka avulla päästään käsiksi HbA_{1c}:n ja HbA₀:n β-N-terminaalsiin heksapeptideihin. Peptidit erotellaan ensin käänteisfaasi-HPLC:llä ja kvantifioidaan sitten joko sähkösumutusmassaspektrometrilla (ESI-MS) tai kapillaarielektroforeesimenetelmällä (CE). [23, s. 78–80; 29, s. 1048–1050.] Massaspektrometri erottelee sähkösumutusmenetelmässä syntyneet ionit massa-varaussuhteessa [1, s. 159]. HbA_{1c} mitataan glykoituneiden ja

glykoitumattomien heksapeptidien suhteena. Menetelmät kalibroidaan käyttäen puhdasta HbA_{1c}- ja HbA₀-standardeista koostuvia seoksia. [23, s. 78–80.]

2.3.2 HbA_{1c}-mittausten historia

Vuonna 1968 Samuel Rahbar julkaisi havaintonsa diabetespotilaiden verestä löytyvästä epänormaalin nopeasti liikkuvasta hemoglobiinifraktiosta [30, s. 296–298]. Tämä hemoglobiinifraktio identifioitiin muun muassa elektroforeettisen ja kromatografisen käyttäytymisen perusteella HbA_{1c}:ksi. Rakenteelliset tutkimukset viittasivat aminosokerin olevan kiinnittyneenä hemoglobiiniin. HbA_{1c}-osuuksien havaittiin nousevan diabeetikoiden veressä jopa kaksinkertaisiksi. [31, s. 838–843.]

Glykoitunutta hemoglobiinia on mitattu laajemmin 1980-luvulta lähtien. Glykoituneiden proteiinien ja näistä erityisesti GHb:n mittaaminen on hyvä kontrollikeino pitkäaikaisen glukoositason seurannassa sekä diabeteksen aiheuttamien komplikaatioiden kehittymisriskin ja hoidon tason arvioinnissa [7, s. 395; 8, s. 450]. Yhtenä merkittävimpänä diabetestutkimuksena on pidetty vuonna 1993 julkistettua laajaa satunnaistettua DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) -seurantatutkimusta, jonka ansiosta viimein ymmärrettiin HbA_{1c}:n todellinen kliininen merkitys. Tutkimuksessa selvitettiin, voitaisiinko intensiivisellä insuliinihoidolla ja pitämällä veren glukoosipitoisuus lähellä normaalia tasoa, vähentää tyypin 1 diabeetikoiden komplikaatioiden esiintyvyyttä ja vakavuutta. Intensiivisesti hoidettujen potilaiden parantunut glykeeminen tasapaino varmennettiin keskimääräisellä 7 % HbA_{1c}-pitoisuudella, mikä oli selkeästi alempi kuin perinteisesti hoidetuilla potilailla. Tutkimuksessa löydettiin veren glukoosipitoisuuden ja pienten verisuonten vaurioitumisen eli mikrovaskulaaristen komplikaatioiden riskin välinen suora suhde. Diabeettisten silmäsairauksien (retinopatia) ja munuaisvaurioiden (nefropatia) riskit olivat suorassa suhteessa keskimääräiseen HbA_{1c}-pitoisuuteen. Tyypin 1 diabeetikoiden intensiivinen hoito sekä viivästytti tehokkaasti diabeettisen retinopatian, nefropatian ja neuropatian (hermovaurio) puhkeamista että myös hidasti niiden kehitystä. [32, s. 977–983; 33, s. 1046–1047.]

Vuonna 1998 UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) julkaisi oman tyypin 2 diabetesta koskevan tutkimuksensa, jossa saatiin vastaavanlaisia tuloksia. Mikrovaskulaarisia komplikaatioita esiintyi vähemmän sulfonyyliurea- tai insuliinihoidolla aikaan saadun parantuneen glykeemisen kontrollin yhteydessä. UKPDS osoitti parantuneen verenpaineen ja glukoositasapainon vähentävän sairaalloisuutta ja ennenaikaisia

kuolemia aiheuttavien komplikaatioiden riskiä. Mahdollisimman varhaisessa vaiheessa tapahtuvalla diagnosoinnilla todettiin olevan suuri merkitys. Diabetekseen liittyvään kuolleisuuteen tai sydäninfarktiin intensiivisellä hoidolla ei kuitenkaan ollut vaikutusta. [33, s.1046–1047; 34, s. 837–851.]

2.3.3 GHb-standardisaatio, HbA_{1c}-yksikkö ja viitearvot

Vuonna 1994 kansainvälinen kliinisen kemian järjestö IFCC perusti erityisen HbA_{1c}-standardisaatiotyöryhmän, jonka tavoitteena oli kehittää erilaisten kansallisten vertailumenetelmien tilalle yhtenäinen kansainvälinen referenssimateriaali ja spesifinen referenssimäärittämismenetelmä. Yhtenäistämällä pyrittiin parantamaan eri laboratorioiden välisten tulosten vertailtavuutta ja pienentämään eri menetelmien välisiä tasoeroja. [10, s. 25.]

GHb:n kansainvälisen standardisaation puute oli johtanut erilaisten kansallisten ohjelmien perustamiseen, joista tunnetuin on NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) -standardisaatio DCCT:tä vastaaviin referenssiarvoihin. Myös muualla, kuten Japanissa ja Ruotsissa, kehitettiin omia HPLC-perusteisia standardiohjelmiä. [8, s. 451; 29, s. 1048–1050.] Ennen NGSP:n harmonisointia oli mitattu ja raportoitu erilaisilla menetelmillä eri muotoja glykoitunutta hemoglobiinia. Tuloksia ilmoitettiin HbA_{1c}:n lisäksi HbA₁:nä, (HbA_{1a}+HbA_{1b}+HbA_{1c}) tai kokonaisglykoituneena hemoglobiinina. Tästä aiheutui laajaa vaihtelua samastakin näytteestä mitatuissa HbA_{1c}-arvoissa. [8, s. 451; 33, s.1046–1047.] Vaikka NGSP:n avulla onnistuttiinkin parantamaan laboratorioiden välistä tulosten toistettavuutta, pidettiin ongelmallisena sitä, että NGSP:n käyttämä HPLC-kationinvaihto-referenssimenetelmä perustui 1980-luvun analysaattoritekniikkaan ja kalibrointia varten tarvittavaa primäärireferenssimateriaalia ei ollut. Tästä johtuen menetelmällä saadut tulokset olivat lähinnä ”parhaita arvioita”, eivät todellisia HbA_{1c}-arvoja. [29, s. 1048–1050.] NGSP/DCCT-metodissa HbA_{1c}:n kanssa eluoituu samanlaisesti noin 2 % ei-HbA_{1c}-fraktioita kuten HbF:ää tai karbamyloitunutta hemoglobiinia [35, s. 1204–1205].

IFCC-standardisaatiolla haluttiin luoda maailmanlaajuinen yhtenäinen metrologisesti tukevalla pohjalla oleva referenssimittaussysteemi. IFCC/IUPAC:n (International Union of Pure and Applied Chemistry) C-NPU-komitea (Committee on Nomenclature, Properties and Units) suositti referenssimenetelmässä spesifisesti mitattavalle β-ketjun N-terminaalisen valiinin glykaatiolle (HbA_{1c}) korrektia tieteellistä nimeä: β-N-1-

deoksifruktosyylihemoglobiini. [10, s. 25–28.] Puhtaat primääriset referenssimateriaalit, jotka koostuvat β -N-terminaalista GHbA:sta ja ei-glykoituneesta HbA:sta, eristettiin terveiden ei-diabeetikoiden kokoverestä. Glykoitumattoman HbA-standardin puhtaus on $> 99,5 \%$, β -N-terminaalisen GHbA:n $> 98,5 \%$. [29, s. 1048–1050.]

Spesifiset referenssimittausmenetelmät perustuvat hemoglobiinimolekyylin entsymaattiseen lohkaaisuun. HbA_{1c}:n ja HbA₀:n β -N-terminaaliset heksapeptidit kvantifioidaan joko ESI-MS- tai CE-menetelmällä (UV-detektio). [29, s. 1048–1050.] HbA_{1c}-tulosten on täytynyt olla jäljitettävissä IFCC-referenssimenetelmään vuoden 2009 lopusta lähtien [9, s. 25]. Vuonna 2002 julkaistut uudet referenssimenetelmät ovat kuitenkin niin vaativia, että ne ovat käytössä lähinnä vain referenssilaboratorioverkon laboratorioissa tai laite- ja menetelmävalmistajilla [9, s. 25; 10, s. 27]. Kansainvälisten vakioden ja referenssimenetelmän julkistaminen on mahdollistanut HbA_{1c}-tulosten käytön paitsi diabeteksen hoidon seurantatutkimuksessa myös osana diabeteksen diagnostiikkaa [4, s. 100].

Standardisaation myötä IFCC suositteli uudelle spesifisemmälle menetelmälle myös SI-järjestelmän mukaista uutta yksikköä: mmol HbA_{1c}/mol Hb (mmol/mol). Aiemmin tulokset on raportoitu %-yksikköisinä (NGSP/DCCT): prosentuaalinen HbA_{1c} (% HbA_{1c}). [10, s. 28.] Prosenttiyksikköä ei pidetä tieteellisesti tunnustettuna yksikkönä ja tämä oli erilaisten NGSP- ja IFCC-systeemien välisten sekaannusten välttämisen ohella yksi syy siihen, miksi haluttiin siirtyä molaariseen SI-järjestelmään [29, s. 1048].

Suomessa siirryttiin kansainvälisen suosituksen mukaisesti käyttämään uutta glykoituneen hemoglobiinin (HbA_{1c}) mmol/mol-yksikköä 3.3.2010 [36]. Suuri osa Euroopasta on siirtynyt mmol/mol-yksikön käyttöön, mutta maailmanlaajuisesti tulosten raportointikäytäntö on vielä jakautunutta [29, s. 1049]. Useissa IFCC- ja NGSP-verkkojen välisissä vertailututkimuksissa on todettu arvojen välinen erinomainen lineaarinen korrelaatio, mutta spesifisemmät IFCC-tulokset ovat merkitsevästi NGSP-arvoja alhaisempia (n. 1,5–2 % riippuen HbA_{1c}-pitoisuudesta). Vertailujen perusteella on voitu kehittää niin kutsutut master-yhtälöt, joilla tuloksia voidaan muuttaa yksiköstä toiseen. [8, s. 454; 33, s. 1047.]

HbA_{1c} -tulokset voidaan muuttaa yksiköstä toiseen seuraavien muuntoyhtälöiden avulla [36]:

$$B-HbA_{1c} (\%) = 0,0915 \times HbA_{1c} (\text{mmol/mol}) + 2,15$$

$$B-HbA_{1c} (\text{mmol/mol}) = 10,93 \times HbA_{1c} (\%) - 23,50$$

Kliinikoiden käytössä on lisäksi plasman keskimääräisen glukoosipitoisuuden (ADAG = A1c-Derived Average Glucose) ja HbA_{1c}-arvojen välinen suhdetaulukko, mutta ePG (estimated Plasma Glucose) / eAG (estimated Average Glucose) -tulosta ei raportoida potilaille suuren yksilöllisen variaation vuoksi [9, s. 25–26; 10, s. 29]. HbA_{1c}-tulosten suhde eri yksiköihin on esitetty taulukossa 1 [26].

Taulukko 1. HbA_{1c}-tulosten NGSP-, IFCC- ja eAG-yksiköiden välinen muuntotaulukko [26].

NGSP HbA _{1c} (%)	IFCC HbA _{1c} (mmol/mol)	eAG (mg/dl)	eAG (mmol/l)
5.0	31	97	5,4
6.0	42	126	7,0
7.0	53	154	8,6
8.0	64	183	10,2
9.0	75	212	11,8
10.0	86	240	13,4
11.0	97	269	14,9
12.0	108	298	16,5

Toistaiseksi Suomessa on ilmoitettu HbA_{1c}-tulosten yhteydessä uuden yksikön rinnalla myös NGSP/DCCT:n mukainen %-yksikkö [10, s. 30; 36]. Suomen Kuntaliiton Laboratoriotutkimusnimikkeistöryhmä on antanut uuteen yksikköön perustuvalle tutkimukselle uuden tutkimuspyyntönumeron 6128, käytettävä lyhenne on B-HbA_{1c} ja pitkä nimi B-Hemoglobiini-A1c [36]. Suomen klinisen kemian yhdistys (SKKY) on suositellut, että 1.1.2013 lähtien HbA_{1c}-tulokset raportoitaisiin Suomessa vain mmol/mol-yksikössä. Euroopassa jo muutamat maat ovat lopettaneet kaksoisvastaukset ja siirtyneet pelkästään mmol/mol-yksikköön. [37, s.117.] Suomessa kuitenkin esimerkiksi Labquality Oy:n HbA_{1c}-kierrostulokset on vuonna 2013 annettu edelleen molemmissa yksiköissä.

Aiemmat HbA_{1c}-viitearvot 4,0–6,0 % perustuivat NGSP/DCCT-jäljitettäviin arvoihin. IFCC:n referenssimenetelmän mukaiset uudet HbA_{1c}-viitearvot terveille henkilöille ovat 20–42 mmol/mol [10, s. 30]. Suomalaisen Lääkäriseura Duodecimin, Suomen Sisätautilääkärien Yhdistyksen ja Diabetesliiton lääkarineuvoston asettaman työryhmän laatiman Käypä hoito -suosituksen tavoitteena on ehkäistä diabetesta, todeta sairaus varhaisessa vaiheessa ja parantaa potilaiden elämänlaatua. Käypä hoito -suosituksen

diabetes-osasta löytyvät Suomessa sovitut yhteiset raja-arvot veren glukoosiarvoille ja glukoosin toimintakokeille sekä HbA_{1c}-arvoille. [5, s. 5–9.]

American Diabetes Association (ADA) on esittänyt, että HbA_{1c}-mittaustuloksen raja-arvoa $\geq 6,5 \%$ (≥ 48 mmol/mol) voitaisiin käyttää tyypin 2 diabeteksen diagnostisena kriteerinä. HbA_{1c}-määritys ei sovellu yhtä hyvin tyypin 1 diagnostiikkaan, mutta sitä voidaan käyttää diabeetikkojen yleisessä hoitotasapainon seurannassa. Suosituksen mukainen diabeetikon hoidon yleinen HbA_{1c}-tavoite on < 53 mmol/mol ja vastaavasti %-yksikkönä ilmoitettuna $< 7 \%$. Yksilölliset tavoitteet voivat olla väljempitä tai tiukempia kuin yleiset. Erityisesti lapsilla HbA_{1c}-tavoite voi olla väljempi hypoglykemiäriskin (matala verensokeri) vuoksi. [5, s. 5–9; 4, s. 100.]

Kahden diabeetikon hoitotasapainoa ei voida verrata ainoastaan HbA_{1c}-arvojen perusteella, sillä punasolujen keskimääräisessä eliniässä voi olla merkittäviä yksilöllisiä eroja. Myös maksa- ja munuaissairaudet voivat vaikuttaa HbA_{1c}-tasoon. Tämän vuoksi tarvitaan lisäksi esimerkiksi plasman glukoosin omaseurantaa. [9, s. 24.] Jos omaseurannan ja HbA_{1c}-arvojen välillä on ristiriita, voi olla tarvetta seuloa potilas hemoglobinopatioiden suhteen. Jollei tarkkaa HbA_{1c}-tulosta ole mittausta häiritsevien tekijöiden vuoksi mahdollista saada, vaihtoehtona voisi olla seerumin glykoituneen proteiinin (fruktosamiinin) määritys. [38.]

2.3.4 Mittausta häiritsevät tekijät

Joidenkin tutkimusten mukaan vuodenaika tai demografiset tekijät, kuten ikä, sukupuoli ja etnisyys, eivät vaikuta kliinisesti merkitsevästi glykohemoglobiiniin tai sen testituloksiin. Iän vaikutuksesta on tosin ristiriitaisia tutkimuksia, joista osassa on todettu arvojen nousevan 30 ikävuoden jälkeen noin 0,1 % vuosikymmenessä. Muissa tutkimuksissa on havaittu vain vähän tai ei lainkaan iän myötä tapahtuvaa nousua. [8, s. 452; 39, s. 1042.] Muutamassa tutkimuksessa on havaittu vuodenaikaista ja lämpötilaan sidottua vaihtelua, minkä seurauksena HbA_{1c}-tasot olisivat korkeampia kylmässä ja talvisai-kaan. Vaihtoehtoisesti tasomuutoksen on epäilty johtuvan lomakaudesta (joulu) ja siihen liittyvästä ylenmääräisestä syömisestä. Etnisyydelläkin voi olla vaikutusta arvoihin, toisten tutkimusten mukaan mustaihaisilla on korkeimmat HbA_{1c}-arvot ja kaukasialaisilla matalimmat. Sukupuolten välillä saattaa esiintyä vaihtelua ja myös yksilötasolla on ilmeisesti olemassa erilaisia fenotyyppijä, joista toisilla glykaatio on nopeampaa ja toisilla hitaampaa kuin voitaisiin normaalisti olettaa. [27, s. 631; 39, s. 1042–1043.]

C- ja E-vitamiinien on havaittu alentavan tuloksia perustuen mahdollisesti niiden hemoglobiinin glykaatiota estävään vaikutukseen. Joissakin menetelmissä C-vitamiini voi kuitenkin myös nostaa tuloksia. D-vitamiini taas on mahdollisesti käänteisessä suhteessa HbA_{1c}-arvoihin, kesällä D-vitamiinitasot ovat korkeampia ja HbA_{1c}-tasot matalampia. Raudanpuuteanemia nostaa tuloksia. Myös hypertriglyseridemia, hyperbilirubinemia, krooninen alkoholismi ja opiaattiriippuvuus voivat häiritä joitakin menetelmiä ja nostaa tuloksia virheellisesti. [8, s. 452; 39, s. 1042–1043.]

Labiili ”esi- HbA_{1c}” (Schiffin emäs) voi aiheuttaa häiriötä erityisesti varauseroihin perustuvissa metodeissa. [8, s. 453; 7, s. 396]. Schiffin emäs voidaan poistaa preanalyttisesti, erotella tai laskea algoritmien avulla [2, s. 139]. Myös hemoglobiinin posttranslationaaliset modifikaatiot, kuten karbamyloatio ja asetyloatio, voivat vaikuttaa mittaustulosten tarkkuuteen [1, s. 153–161]. Häiriövaikutusten suuruus vaihtelee eri kaupallisten menetelmien välillä. Kemialliset modifikaatiot esimerkiksi saattavat matkia glykohemoglobiinia fysikaalisesti ja kemiallisesti, mikä voi johtaa analyysien epätarkkuuteen. [1, s. 154.] Karbamyloidulla hemoglobiinilla on HbA_{1c}:n kanssa samankaltainen isoelektrinen piste, mikä voi häiritä varauseroihin perustuvia menetelmiä. [1, s. 159.] Kaikki ioninvaihto-HPLC-menetelmät eivät detektoi karbamyloitua hemoglobiinia [2, s. 139], ja se saattaa joissakin menetelmissä eluoitua yhdessä HbA_{1c}:n kanssa. Immuno- ja boronaattiaffiniteettimenetelmiin ei ureemisten potilaiden karbamyylitasoilla näytä olevan vielä vaikutusta. [1, s. 155–159.]

Hyperureemisten potilaiden yhteydessä pitäisi huomioida myös mahdollinen GHb-tuloksia alentava punasolujen lyhentynyt elinikä sekä toisaalta tuloksia nostava heikentynyt glukoosin sietokyky (IGT). Weykampin ym. tutkimuksessa (1993) havaittiin *in vitro*-syntetisoidun karbamyloidun ja asetyloidun hemoglobiinin häiritsevän HPLC- ja elektroforeesimenetelmiä, mutta ei vaikuttavan affiniteettikromatografisiin tai entsyymaattis-immunokemiallisiin menetelmiin. Myös *in vivo*-syntetisoitu karbamyloitu hemoglobiini häiritsi HPLC- ja elektroforeesimenetelmiä. Sen sijaan asetyloidun hemoglobiinin synnyssä *in vivo*, kroonisen asetyylisalisylaatin (aspiriini) käytön tai lyhytaikaisen suuren altistuksen yhteydessä, vastaavaa häiriötä ei havaittu mahdollisesti nopeamman elimistössä hajoamisen tai verenkierrosta poistumisen vuoksi. [24, s. 138–142.] Toisissa tutkimuksissa on tästä poiketen kuitenkin havaittu kroonisen salisylaattialtistuksen voivan häiritä joitakin menetelmiä ja nostavan virheellisesti tuloksia [8, s. 452].

Hemoglobiinivariantit ovat heterotsygoottisessa muodossa yleensä oireettomia, mutta niiden kliininen merkitys voi silti olla suuri, jos ne johtavat virheellisiin mittaustuloksiin [28, s. 156]. HbA_{1c}-testauksen yleistyessä myös näytepyyntöjen määrät ovat kasvaneet ja potilaskirjo laajentunut. Etnisissä ryhmissä jonkin tietyn variantin esiintyvyys voi olla kohonnut. Tämä yhdistettynä tyypin 2 diabeteksen kasvaneeseen esiintyvyyteen, on glukoositasapainon seurannassa merkittävä asia. [2, s. 135–136.] Hemoglobinopatiasta ja käytetystä menetelmästä riippuen tulokset voivat virheellisesti joko kohota tai laskea [8, s. 452]. NGSP on koonnut internetsivuillaan (www.NGSP.org) tietoa muun muassa siitä, missä yleisimmissä kaupallisissa menetelmissä esiintyy häiriöitä, mikäli näytteessä on HbC-, HbS-, HbE-, HbD- tai HbF-variantteja [40]. Hemoglobinopatiat vaikuttavat vähemmän boronaatti-affiniteetikromatografisiin menetelmiin kuin varuseroihin perustuviin menetelmiin [8, s. 452]. Hb-variantit, joilla glykaatio on lisääntynyt (esim. Hb Himeyiji) tai vähentynyt, voivat kuitenkin häiritä analyysiä [28, s. 154].

Immunokemialliset ja affiniteetikromatografiset menetelmät eivät detektoi hemoglobiinivariantteja eivätkä siten pysty tunnistamaan potilaita, joilla on hemoglobinopatioita. Vasta-aineiden spesifisyys määrittelee, mitä glykoituneita osia erilaiset immunomenetelmät tunnistavat. [2, s. 139.] Kaupallisissa immunoperusteisissa HbA_{1c}-menetelmissä käytetään vasta-ainevälitteistä lateksiagglutinaation inhibitiota tai immunoturbidimetrisiä metodeja. Spesifiset vasta-aineet tunnistavat N-terminaalisen glykoituneen aminohapon hemoglobiinin β-ketjun ensimmäisten 4–10 aminohapon perusteella. Vasta-aineet eivät tunnista Schiffin emästä tai muita glykoituneita Hb-lajeja tai kemiallisesti modifioituja johdannaisia. [1, s. 157.]

Immunomenetelmistä ainakin Olympus AU400 -menetelmän on osoitettu antavan kliinisesti merkitsevästi virheellisen korkeita HbA_{1c}-tuloksia HbS- ja HbC-piirteen sisältävissä potilasnäytteissä [41, s. 136–139]. Sama pätee myös Abbott Architect -immunomenetelmään. Koska menetelmä ei pysty erottelemaan glykoituneita hemoglobiinivariantteja (S, C, D ja E), se mittaa ja raportoi ne HbA_{1c}:nä. Valmistaja ei suosittele heterotsygoottisia CC- ja SS- tai SC-variantteja sisältävien näytteiden HbA_{1c}-tulosten käyttöä kliinisessä tarkoituksessa, ja D- ja E-tapauksissakin tuloksia pitäisi tulkita varauksella. [2, s. 139.] Yleisesti ottaen immunokemialliset menetelmät eivät kliinisesti merkitsevästi häiriinny HbE- ja HbD-varianteista, koska nämä variantit synnyttäneet substituuotit sijaitsevat kaukana immunologisten menetelmien tunnistusalueista eli hemoglobiinin β-ketjun N-terminuksesta. [1, s. 161; 40.] Ongelmana on kuitenkin se, että tällä hetkellä ei tarkasti tiedetä, miten hemoglobinopatia vaikuttaa glykaatitasoon tai onko variantilla ja

sen glykoituneella fraktiolla mahdollisesti HbA_{1c}:stä poikkeava elinikä, mikä voi johtaa glykeemisen altistuksen virheelliseen arviointiin. Hemoglobiнопатia-potilaiden yhteydessä HbA_{1c}-tulokset eivät välttämättä ole vertailukelpoisia kliinisten ohjearvojen kanssa, sillä aiheesta ei ole olemassa riittävästi tutkimustuloksia, jotta niille normaaleja viitearvoja olisi voitu määrittää. [2, s. 140–144.]

Kun HbF-pitoisuudet ovat < 5 %, ei tällä näytä olevan merkittävää vaikutusta suurimpaan osaan GHb-menetelmistä [1, s. 153]. Kun HbF > 10 %, immunomenetelmillä voidaan saada virheellisen matalia tuloksia [2, s. 139]. Gamma- ja β-ketjuilla on β-ketjun kymmenestä ensimmäisestä aminohaposta vain neljä yhteistä, jolloin useimmilla menetelmissä käytetyistä vasta-aineilla on vain vähän, jos lainkaan immunoreaktiivisuutta HbF:n kanssa. [1, s. 153; Sofronescu, s. 154.] Myös muut Hb-variantit, joilla on muutoksia ensimmäisissä 4–10 N-terminaalisissa aminohapoissa, voivat aiheuttaa samankaltaisia tuloksia. Esimerkiksi Hb Graz- ja Hb Raleigh -varianttien on osoitettu laskevan HbA_{1c}-arvoja. [Bry, s. 157.] Koska immunomenetelmissä HbA_{1c}-% lasketaan HbA_{1c}- ja kokonaishemoglobiinipitoisuuksista (THb = total hemoglobin), mikä tahansa tekijä, joka estää glykaatiota tai vasta-aineiden tunnistusreaktiota, tuottaa virheellisen matalia tuloksia. Esimerkiksi Hb Raleigh'n β-ketjun N-terminaalinen asetiloitunut alaniini ei voi glykoitua, mikä estää vasta-aineen tunnistusreaktion. Hb Raleigh on kuitenkin mukana kokonaishemoglobiinipitoisuudessa, ja täten laskennassa saadaan virheellisen matalia tuloksia. [28, s. 153–156.]

Kationinvaihtokromatografiassa HbA:sta ja HbA_{1c}:stä erillään eluoituvat hemoglobiinivariantit tai johdannaiset eivät yleensä häiritse menetelmiä, koska ne eivät vaikuta $\% HbA_{1c} = 100 \times \frac{HbA_{1c}}{HbA + HbA_{1c}}$ -yhtälöön. Ongelmia syntyy, jos poikkeavia muotoja ei pystytä erottamaan HbA:sta ja HbA_{1c}:stä. Tällaisia tilanteita ovat muun muassa natiivin hemoglobiinivariantin eluoituminen samalla retentioajalla kuin HbA_{1c}, mikä johtaa HbA_{1c}-tulosten merkittävään yliarviointiin. Esimerkiksi Hb Raleigh, Hb Graz, Hb Sherwood Forest, Hb South Florida ja Hb Niigata voivat eluoitua yhtä aikaa HbA_{1c}:n kanssa. [1, s. 155–156.]

Toinen ongelmatilanne muodostuu, kun glykoitunut hemoglobiinivariantti eluoituu HbA_{1c}:n kanssa, mutta ei-glykoitu variantti on erillään HbA:sta. Tämä johtaa HbA_{1c}-tulosten yliarviointiin. Kolmas tulosten tarkkuuteen vaikuttava tilanne syntyy, kun hemoglobiinivariantti eluoituu yhdessä HbA:n kanssa, mutta glykoitunut variantti erottuu HbA_{1c}:stä. Tällöin saadaan virheellisen matalia HbA_{1c}-tuloksia. Kationinvaihtokromato-

grafisten menetelmien välillä on eroa, sama variantti saattaa tuottaa hyvin erilaisia HbA_{1c}-tuloksia eri menetelmillä. [1, s. 155–156.] Koska homotsygoottisilla potilailla ei ole HbA_{1c}:tä, tuloksia ei tällaisissa tapauksissa voida ioninvaihtokromatografiassa raportoida. Yhden hemoglobiinivariantin omaavilla heterotsygoottisilla potilailla voidaan saada aikaan ideaali erotus kromatogrammissa, mutta tuloksia tulisi silti tulkita varoen, koska kuten edellä todettu, glukoosin ja HbA_{1c}:n välisestä suhteesta tai viitearvoista hemoglobiinopatioiden yhteydessä ei vielä ole riittävästi tietoa. [2, s. 139.]

Mikäli näytteessä esiintyy jotakin mittausta häiritsevää elementtiä, tulisi tämä identifioida, jotta voidaan valita sellainen menetelmätyyppi, johon ko. variantti tai johdos ei vaikuta häiritsevästi [1, s. 153]. Epätarkat mittaustulokset voivat johtaa diabetespotilaan yli- tai alihoitoon [38; 41, s. 139]. Jos näytteen HbA_{1c}-tulos on hyvin alhainen tai ylittää 15 % tai potilaan tuloksissa näkyy merkittävä muutos eri määritysmenetelmiä käytettäessä, tulisi selvittää, löytyykö henkilöltä mahdollisesti jokin variantti tai näkykö merkkejä punasolujen ennenaikaisesta tuhoutumisesta. [1, s. 153; 2, s. 141; 8, s. 453.] Suomessa (esimerkiksi Huslabilta) on mahdollista tilata B-Hb-IEF -tutkimus, jonka avulla varianttien suhteellisia osuuksia selvitetään isoelektrisen fokusoinnin avulla. IEF on yleisimmin käytetty hemoglobiinirakenteen seulontateknikka, jossa rakenteen poikkeama havaitaan hemoglobiinin varausmuutoksena. Havaitseminen edellyttää, että aminohapon vaihtuminen aiheuttaa varausmuutoksen. [16, s. 9.] Yleisimpien varianttien määrittäminen voidaan lisäksi tehdä kationinvaihtokromatografisesti (HPLC) tai kapillaarielektroforeesilla, mutta joissakin tapauksissa variantit saadaan selville vain käyttämällä ES-MS-analyysiä tai sekvensoimalla ilmentyneitä globiinigeenejä. [1, s. 161; 16, s. 9.] Myös sukutausta, etninen alkuperä ja punasolumorfologia [17, s. 238] sekä potilashistoria [2, s. 141] voivat auttaa hemoglobiinopatioiden diagnosoinnissa.

IFCC-referenssimenetelmät (ESI-MS ja kapillaarielektroforeesi) tuottavat spesifisiä mittaustuloksia eikä HbA-molekyylin geneettisillä tai kemiallisilla modifioinneilla (asetylointi tai karbamylointi) näytä yleisesti ottaen olevan näihin menetelmiin vaikutusta. Säilöntäaineena käytetyn natriumatsidin on havaittu häiritsevän menetelmiä, ja siksi se on poistettu kalibraattoriseoksista. [23, s. 83.] Referenssimenetelmissä kallis hinta ja niiden monimutkaisuus rajoittavat käyttöä tavallisissa kliinisissä laboratorioissa. [1, s. 159; 28, s. 154.]

Mikä tahansa punasolujen elinikään lyhentävästi vaikuttava patologinen tila (esim. hemolyysi, verenvuoto tai verensiirto) johtaa kaikissa menetelmissä mittaustuloksesta

riippumatta virheellisen alhaisiin HbA_{1c}-arvoihin. [8, s. 452; 40]. Millään käytetyllä menetelmällä glykohemoglobiini ei myöskään heijasta oikein pitkäaikaista glukoositasoa, jos yksilöllä on homotsygoottinen HbCC-, HbSS- tai HbSC-sairaus tai muu vastaava häiriötila. [1, s. 153; 8, s. 451.] Erytyisen monimutkainen tilanne on silloin, kun yksilöllä on useampia mittaustuloksiin vaikuttavia poikkeavuuksia, kuten esimerkiksi sekä HbS- että Hb Raleigh -variantit [28, s. 153–155]. Tällöin voi olla syytä käyttää hemoglobiini-menetelmän sijasta tai lisäksi glukoosiseurantaa ja/tai vaihtoehtoisia pitkäaikaista glykeemistä kontrollia kuten GSP (glycated serum proteins) tai GSA (glycated serum albumin). GSP:n tai GSA:n ei kuitenkaan ole HbA_{1c}:n tavoin havaittu korreloivan diabeteksen aiheuttamien pitkäaikaisten komplikaatioiden kanssa. Nämä menetelmät kertovat myös ainoastaan parin viimeisen viikon (15–30 pv) keskimääräisestä glukoositasosta, paastoglukoosi vain muutaman päivän, eivät 2–3 kuukauden tilanteesta kuten HbA_{1c}. [1, s. 153–154; 2, s. 141–143; 8, s. 451; 28, s. 155.]

Yhteenvetona voidaan todeta, että jos tiedetään, ettei potilaalla ole Hb-varianttia eikä muitakaan HbA_{1c}-tuloksiin vaikuttavia tekijöitä, voidaan käyttää mitä tahansa mittausmenetelmää. Mikäli on pieni riski siitä, että Hb-variantti tai muu tekijä vaikuttaa HbA_{1c}-mittauksiin, voidaan edelleen käyttää mitä tahansa mittausmenetelmää, mutta lisäksi suositellaan käyttämään muitakin glykemiamäärityksiä sekä mittausmetodiltaan erilaisia HbA_{1c}-menetelmiä. Jos tuloksissa esiintyy ristiriitaisuuksia, selvitetään mahdolliset hemoglobiinipoikkeavuudet. Jos etukäteen etnisen taustan, maantieteellisen sijainnin tai kliinisen tilan perusteella on olemassa suuri riski, että potilaalla on jokin mittausta häiritsevä tekijä, selvitetään tilanne ennen HbA_{1c}-mittausta. Häiritsevän tekijän löytyessä käytetään HbA_{1c}-mittaukselle vaihtoehtoisia menetelmää. [2, s. 142.] Vaikka erilaisten häiriötekijöiden olemassaolo onkin tiedostettava, loppujen lopuksi vaihtoehtoisia tutkimusmenetelmiä vaativia tapauksia on kuitenkin suhteellisen pieni määrä. Suurimmalle osalle diabeetikoista HbA_{1c} on paras tapa arvioida pitkäaikaista glukoositasapainoa [28, s. 156].

2.3.5 Laadunarviointi

Suositus eri HbA_{1c}-menetelmien väliseksi suhteelliseksi variaatiokertoimeksi (CV = coefficient of variation) on CV < 5 %, ideaalina pidetään CV < 3 %. Laboratorion sisäisen CV:n tulisi olla < 3 % ja laboratorion välisten < 5 %. Menetelmän suorituskykyä ja sen antamien tulosten tasoa laboratoriossa tulisi valvoa vähintään kahden eri tasoa olevan kontrollin (korkea ja matala taso) avulla, jotka ajetaan ennen näyteajoa ja näy-

teajon päätteeksi. Tarjolla on kaupallisia lyofilisoituja eli kylmäkuivattuja kontrolleja, mutta lisäksi suositellaan esimerkiksi laboratorion omia sisäisiä $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa säilytettyjä, kerta-annoksiin jaettuja kokoverikontrolleja. Viitearvojen ala- ja yläpuoliset näytteet tulisi varmentaa uusinoilla. Laboratorioille suositellaan osallistumista myös ulkoisille laadunarviointikierroksille, joissa voidaan verrata laboratorion suorituskkyä muihin laboratorioihin. [8, s. 451–453.]

HbA_{1c}-analytiikka on Suomessa tällä hetkellä hyvällä kansainvälisellä tasolla. Kaikkien laboratorioden kokonaisvariaatio Labquality Oy:n ulkoisilla laadunarviointikierroksilla on pienentynyt 1990-luvun tilanteesta alle puoleen. Kliinisesti merkittäväällä 6,5–7,0 %:n HbA_{1c}-alueella ollaan %-yksikköisten tulosten osalta jo lähestymässä tavoitetta, $\text{CV} \leq 3\%$. Mmol/mol-yksikköisten tulosten variaatiokerroin (CV-%) on suurempi. Suomessa Labquality-kierrosten keskiarvot sekä %- että mmol/mol-yksiköissä ovat olleet vuodesta 2010 lähtien vähän Euroopan referenssilaboratorion arvoja korkeampia, mutta viime aikoina (2011–2012) tulosten välinen ero on kaventunut. Tämä johtuu ilmeisesti menetelmien yhdenmukaistumisesta. Immunokemialliset menetelmät näyttävät toimivan nestekromatografisia menetelmiä tarkemmin. [4, s.101–102.] Eräiden immunokemiallisten menetelmien keskiarvotulokset ovat olleet lähellä referenssilaboratorion arvoja sekä %- että mmol/mol-vastauksissa. Jotkin nestekromatografiset menetelmät puolestaan ovat antaneet referenssilaboratoriota korkeampia arvoja nostaen kierroskeskiarvoa. [42–44.]

Erilaisten metrologisten systeemien välistä variaatiota ei voida verrata pelkästään suhteellisina prosentteina, kun eri yksiköiden välisessä yleisessä muuntoyhtälössä y-akselin leikkauspiste (= b) ei ole nolla. IFCC-yksikköisten (mmol/mol) tulosten muuntoyhtälössä NGSP/DCCT-yksikköön (%) leikkauspiste on 2,15, mikä heijastaa systeemien välistä erilaista spesifisyyttä. IFCC-yksikössä mitattuna biologinen vaihtelu vaikuttaa suuremmalta, samoin tulosten referenssiväli on laajempi ja sitä kautta myös analyttiset tarkkuustavoitteet ovat väljemmät kuin vähemmän spesifisessä %-yksikköisessä NGSP/DCCT-systeemissä. Tästä johtuen asetetut tavoitteet ja laatuvaatimukset esimerkiksi ulkoisilla laadunarviointikierroksilla ja menetelmien suorituskkyä arvioidessa riippuvat käytetystä yksiköstä. [35, s. 1204–1205.]

Labquality Oy:n laatuvaatimus HbA_{1c}:n tuloksille on kierroksen keskiarvo $\pm 10\%$. Tasolla HbA_{1c} noin 6,5 % on 2010-luvulla Suomessa jo päästy kansainvälisesti hyvälle tasolle (CV-%: 3–4), joten rajoja voitaisiin esityksen mukaan hyvin kiristää ka $\pm 6\%$:iin, jotta saataisiin yhä luotettavampia tuloksia. Tuloksissa, jotka ovat yksikössä mmol/mol,

tarvitaan laajempia tavoitearvoja, ja siksi on suositeltu siirtymistä vain $\pm 9\%$:iin. [4, s. 101–102.] Toistaiseksi Labqualityn vuoden 2013 HbA_{1c}-kierroksilla on kuitenkin edelleen ollut käytössä vanhat laatutavoitteet. [42–44.]

Labquality Oy:n HbA_{1c}-kierroksilla analysoidaan neljä näytettä, joista kaksi on natiiveja EDTA-kokoverinäytteitä ja kaksi kylmäkuivattuja humaaniverinäytteitä. Hollantilainen European Reference Laboratory for Glycohemoglobin (ERLGH) on määrittänyt sekundaarista referenssimenetelmää käyttäen kahta eri tasoa oleville kokoverinäytteille IFCC- ja DCCT-jäljitettävät tavoitearvot. Määrittämisessä käytetään kahta mittausperiaatettaan erilaista referenssimenetelmää: Menarini HA8160 HPLC (ioninvaihto) ja Primus HPLC (affiniteetikromatografia). Kylmäkuivatuille näytteille ei ole olemassa referenssiarvoja ja niiden kokonaisvariaatiot ovat yleensä olleet Labquality-kierroksilla aina suuremmat kuin EDTA-näytteiden. [42–44.] Lyofilisoitu materiaali voi olla altis matriksin vaikutukselle [8, s. 453] ja prosessoiduista näytteistä saatuja tuloksia tulisi verrata varauksella esimerkiksi DCCT:hen [47].

3 Validoinnissa käytetyt menetelmät

3.1 Architect c8200 -analysaattori

Architect c8200 (kuva 1) on kliinisen kemian (c8000) ja immunokemian (i2000SR) moduleista koostuva automaattinen analysaattori (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Se on suodatinfotometri, jonka valonlähteenä on volframi-halogeenilamppu (aallonpituudet 340–804 nm). Sisäänrakennetulla kehällä olevien kvartsikyvetien valotien pituus on 5 mm, tilavuus 360 µl. Analysaattorissa on automaattinen näytteenkäsittelyyksikkö (RSH), jonka kapasiteetti on 150 rutiininäytettä. Architect c8000:n maksimianalysointinopeus on 800 testiä/h, nopeus vaihtelee eri testimenetelmien välillä.



Kuva 1. Architect c8200 -analysaattori [valokuvaaja: Kati-Henna Pystynen].

3.2 Vanha immunoturbidimetrisen Architect c8000 HbA_{1c} -menetelmä

3.2.1 Menetelmän periaate

Abbottin immunoturbidimetrisessä menetelmässä kokoverinäytteestä määritetään kah-
ta pitoisuutta: glykohemoglobiinia (HbA_{1c}) sekä kokonaishemoglobiinia (THb). Ennen
analyysiä näytteet esikäsitellään manuaalisesti MULTIGENT Hemoglobin Denaturant -
denaturoimisaineella. Punasolut hajotetaan ja hemoglobiini pilkotaan proteolyttisellä
entsyymillä (pepsiinillä) hemolysaatin muodostamiseksi. Kokonaishemoglobiinipitoi-
suus määritetään kolorimetrisesti. Hemolysaatti muutetaan värilliseksi (vihreä) hema-
tiiniksi, joka mitataan aallonpituudella 604 nm. Näytteestä mitattua absorbanssia verra-
taan kokonaishemoglobiinin kaksipistekalibroitisuoraan. [45; 46.]

HbA_{1c}-pitoisuus määritetään immunoturbidimetrisesti mikropartikkeli-agglutinaatio-
inhibitio-menetelmällä. HbA_{1c}-vasta-aine sisältää spesifisiä hiiren monoklonaalisia anti-
HbA_{1c}-vasta-aineita mikropartikkeleihin sidottuina. HbA_{1c}-agglutinaattori puolestaan
sisältää useita kopioita HbA_{1c}:n immunoreaktiivisesta osasta sidottuna kovalenttisesti
polymeeriin. Kun näytteessä ei ole HbA_{1c}:tä, agglutinaattorin HbA_{1c} sitoutuu mikropar-
tikkeleihin sidottuihin vasta-aineisiin ja muodostaa saostuman. Kun näytteessä on
HbA_{1c}:tä, näytteen HbA_{1c} kilpailee agglutinaattorin HbA_{1c}:n kanssa mikropartikkeleiden

sitoutumispaikoista. Näytteen HbA_{1c} hidastaa saostuman muodostumista, jolloin sen muodostumisnopeus on kääntäen verrannollinen näytteen HbA_{1c} -pitoisuuteen. Absorbanssi mitataan aallonpituudella 700 nm ja sitä verrataan HbA_{1c} :n kuusipistekalibrointisuoraan. Kalibraattorin arvot ovat jäljitettävissä NGSP:hen ja IFCC:hen:

$$\text{Perinteinen yksikkö (NGSP): } \left(\frac{\text{HbA}_{1c} \text{ (g/dl)}}{\text{THb (g/dl)}} \times 100 \right) - 3 + (0,2 \times \text{THb (g/dl)}) = \% \text{HbA}_{1c}$$

$$\text{SI-yksikkö (IFCC): } \left(\frac{\text{HbA}_{1c} \text{ (mmol/l)}}{\text{THb (mmol/l)}} \right) \times 1000 \text{ mmol/mol} = \text{mmol/mol HbA}_{1c}$$

HbA_{1c} -% on HbA_{1c} /THb-suhde, joka muunnoskertoimen avulla korreloi NGSP-sertifioidun HPLC-referenssimenetelmän kanssa. HbA_{1c} -fraktio on HbA_{1c} /THb-suhde mmol/mol-yksikössä ilmaistuna käyttäen hyväksi IFCC-jäljitettäviä arvoja. [45, s. 1–2; 46, s. 1–3.]

3.2.2 Menetelmän rajoitukset

THb-pitoisuuden on oltava $> 4,34$ tai $< 14,27$ mmol/l. Menetelmä ei sovellu sellaisten potilaiden näytteiden analysointiin, joilla on jokin punasolujen elinikää lyhentävä tila, kuten hemolyyttinen sairaus, raskaus, tai merkittävä akuutti tai krooninen verenhukka. Menetelmä ei sovellu glykeemisen kontrollin seurantaan yksilöillä, joilla on homotsygoottinen HbS- tai HbC-variantti tai > 5 % HbF-varianttia. Homotsygoottisilla HbS:llä ja HbC:llä on lyhentynyt punasolujen elinikä, jolloin saadaan glykeemisestä kontrollista riippumattomasti alentuneita HbA_{1c} -arvoja. Jos HbF > 10 %, saadaan virheellisesti alentuneita HbA_{1c} -arvoja, sillä suurempi osuus glykoituneesta hemoglobiinista on glykoituneen HbF:n muodossa. Tällöin verrattaessa tuloksia julkaistuihin viitearvoihin, HbA_{1c} ei heijasta glykeemistä tilaa oikein. [46, s. 1–3.]

HbS- ja HbC-variantit voivat antaa virheellisen korkeita tuloksia. HbE-variantilla on yleisesti ottaen vähän vaikutusta immunomenetelmiin, häiriötä ei ole erikseen testattu tällä menetelmällä. Kaikissa hiiren monoklonaalisia vasta-aineita käyttävissä menetelmissä on häiriön mahdollisuus näytteissä, jotka on otettu potilailta, joilla on HAMA (human anti-mouse antibodies) eli anti-hiiri-vasta-aineita. Labiili HbA_{1c} ei vaikuta menetelmään, koska vasta-aine on spesifinen HbA_{1c} :n ketoamiinimuodolle. Menetelmässä käytetty vasta-aine ei tunnista muita glykoituneita hemoglobiinimuotoja, kuten HbA_{1a} :ta ja HbA_{1b} :tä. Karbamyloidulla hemoglobiinilla ei ole todettu häiritsevää vaikutusta. Asetyloi-

tua hemoglobiinia ei ole tämän menetelmän yhteydessä erikseen tutkittu, mutta toisaalla on raportoitu, että jos aspiriinia nautitaan < 1 g/pv, tällä ei ole häiritsevää vaikutusta. Taulukossa 2 on esitetty menetelmää mahdollisesti häiritsevät yhdisteet. Taulukossa annetuilla pitoisuuksilla interferenssin määrä on $\pm 0,75$ % HbA_{1c} ($\pm 6,9$ mmol/mol HbA_{1c}). [46, s. 1–3.]

Taulukko 2. Immunosensitiviteetti Architect c8000 HbA_{1c} -menetelmää häiritsevät yhdisteet.

Häiritsevä yhdiste	Pitoisuus
Bilirubiini	855 µmol/l
Lipemia (triglyseridi)	11,3 mmol/l
Reumafaktori (RF)	3100 kU/l
Asetyylisalisylaatti	2,8 mmol/l
Natriumsyanaatti	7,7 mmol/l
Askorbiinihappo	2,8 mmol/l
Urea	238 mmol/l
Gammaglobuliini	50 g/l

3.3 Uusi entsymaattinen Architect c8000 HbA_{1c} -menetelmä

3.3.1 Menetelmän periaate

Analyysit voidaan suorittaa joko suoraan kokoverestä automaattisovelluksella (Whole Blood application) tai valmistamalla hemolysaatit (Hemolysate application) manuaalisesti ennen analysointia syöttöä. Valmistaja Abbott Laboratories on NGSP-sertifioinut molemmat sovellukset toukokuussa 2013, ja ne ovat jäljitettävissä DCCT-referenssimenetelmään [47]. Sertifiointi on voimassa aina vuoden kerrallaan. Hemoglobiini A_{1c} -menetelmä koostuu kahdesta eri pitoisuusmittauksesta: glykoituneesta hemoglobiinista (HbA_{1c}) ja kokonaishemoglobiinista (THb). Näitä kahta pitoisuutta (µmol/l) käytetään HbA_{1c}:n prosentuaalisen osuuden (NGSP-yksikkö) tai hemoglobiini-fraktion mmol/mol -osuuden (IFCC-yksikkö) määrittämisessä. Yksittäisiä HbA_{1c}- ja/tai THb-arvoja ei pitäisi käyttää diagnostiikassa, vaan niiden avulla ainoastaan lasketaan HbA_{1c}/THb-suhdetta:

$$\text{HbA}_{1c} \text{ (mmol/mol)} = (\text{HbA}_{1c}/\text{THb}) \times 1000$$

$$\text{HbA}_{1c} \text{ (%) } = \text{IFCC} \times 0,09148 + 2,152$$

HbA_{1c}-mittauksessa hyödynnetään entsyymaattista menetelmää, jolla mitataan spesifisesti HbA_{1c}:n β -ketjun N-terminaalisia fruktosyylidipeptidejä. Näytteen esikäsittelyvaiheessa erytrosyytit hajotetaan ja hemoglobiini muuttuu sen ja natriumnitriitin välisessä reaktiossa methemoglobiiniksi. Kun näytteeseen lisätään reagenssi 1:tä, proteaasi irrottaa hemoglobiinin β -ketjun glykoituneen N-terminaalisen dipeptidin (fruktosyyli-VH). Tällöin methemoglobiini hapettuu natriumatsidin toimesta stabiiliksi methemoglobiiniatsidiksi ja kokonaishemoglobiinin (THb) pitoisuus voidaan määrittää mittaamalla absorbanssia aallonpituudella 476 nm. Reagenssi 2:sen lisäys käynnistää reaktion, jossa fruktosyyli-peptidi-oksidaasin annetaan reagoida fruktosyyli-VH:n kanssa. HbA_{1c}-pitoisuus mitataan määrittämällä reaktiossa syntyvää vetyperoksidia. Absorbanssia mitataan aallonpituudella 660 nm. [3; 48.]

3.3.2 Menetelmän rajoitukset

Hemoglobiini A_{1c} -menetelmä on tarkoitettu käytettäväksi Abbott Architect c8000 - ja c4000 -systeemeissä, ohjelmistolla v8.1 tai uudempi. Menetelmää ei saisi käyttää sellaisten potilaiden diabeteksen diagnosoinnissa tai seurannassa, jotka kärsivät hemoglobinopatiasta, mutta joilla on normaali punasolujen vaihtuvuus (esim. sirppisolupiiiri) tai potilailla, joilla on epänormaali punasolujen vaihtuvuus. Menetelmä ei sovellu potilaille, joilla on raudanpuute ja hemolyyttinen anemia, erilaisia hemoglobinopatioita, talassemioita, perinnöllinen sferosytoosi, maligniuksia tai vaikea krooninen maksa- tai munuaistauti. Testi ei myöskään korvaa tyypin 1 diabetespotilaiden, raskaana olevien tai lapsipotilaiden veren glukoosimääryityksiä. [3.]

3.3.3 Näytteiden säilyvyys

Mikäli vain on mahdollista, analysoinnissa käytetään tuoreita näytteitä. Kokoverinäytteet säilyvät huoneenlämmössä 8 h ja +2–8 °C:ssa 7 vrk. Jos näytteitä ei ajeta viikon sisällä, näytteet tulisi pakastaa –70 °C:seen tai sitä kylmempään. Säilytystä –20 °C:ssa ei suositella, koska näytteet eivät tällöin säily stabiileina. Useimpien mittausten menetelmien kannalta näytteet säilyvät pitkällä aikavälillä stabiileina (väh. 12–18 kk), kun niitä on säilytetty –70 °C:ssa. [7, s. 397; 8, s. 452.] Yli vuosikymmenenkin kestäneen säilytyksen jälkeen pakastetuista kokoverinäytteistä on saatu (ioninvaihto-HPLC) hyvin toistettavia, joskin alkuperäistä hivenen korkeampia ja vaihtelevampia HbA_{1c}-tuloksia [49, s. 1726–1730]. Useampaa kuin yhtä näytteiden pakastus-/sulatuskiertoa tulisi välttää.

Hemolysaatteja voidaan säilyttää 4 h huoneenlämmössä tai 24 h +2–8 °C:ssa. Hemolysaatteja ei saa pakastaa. [3.]

3.3.4 Spesifinen suorituskky

Lineaarisuus ja toteamisraja

Hemoglobiini A_{1c} -menetelmän mittaustalue on 4,0–15,0 % HbA_{1c} (20,22–140,45 mmol/mol HbA_{1c}). Valmistajan lineaarisuudelle antamat toleranssit eri näytepitoisuusalueilla sekä IFCC- että NGSP-yksiköissä on esitetty taulukossa 3. Matalalla näytetäsoalla (< 38,78 mmol/mol tai < 5,7 %) sallittu vaihteluväli on annettu absoluuttisina lukui-na ei suhteellisina osuuksina. [3.]

Taulukko 3. Entsymaattisen Architect c8000 HbA_{1c} -menetelmän lineaarisuus ja sen sallittu vaihteluväli.

Näytetaso (mmol/mol HbA _{1c})	< 38,78	38,78–53,00	> 53,00
Toleranssi	± 1,53	± 5 %	± 7 %
Näytetaso (% HbA _{1c})	< 5,7	5,7–7,0	> 7,0
Toleranssi	± 0,14	± 3 %	± 5 %

Valmistajan antamat mittauksen raja-arvot taustalle (LOB = Limit of Blank) ja toteamis-raja (LOD = Limit of Detection) eli pienin pitoisuus, jolla voidaan luotettavasti todeta näytteen sisältävän tutkittavaa analyyytiä, on esitetty taulukossa 4. [3.]

Taulukko 4. Entsymaattisen Architect c8000 HbA_{1c} -menetelmän tausta- ja toteamisrajat.

Hemoglobiini A _{1c} -parametri	Taustaraja (LOB)	Toteamisraja (LOD)
HbA _{1c}	32 µmol/l	33 µmol/l
THb	130 µmol/l	296 µmol/l

Spesifisyys

Hemoglobiinijohdannaisten HbA_{1c}-tuloksiin aiheuttamaa vaikutusta tutkittaessa ei ase-tyloidun, karbamyloidun tai labiilin hemoglobiinin ole havaittu häiritsevän mittausta. Hemoglobiinivariantteja (HbC, HbD, HbE, HbS ja HbF) tutkittaessa on menetelmän todettu olevan altis häiriöille, kun HbA₂:n osuus kokonaishemoglobiinista on > 5 % tai HbF:n > 20 %. Korkeat (40 %) varianttipitoisuudet saattavat alentaa tuloksia: HbC (–

2,2 %), HbD (–1,4 %) ja HbS (–1,2 %). Konjugoitu ja ei-konjugoitu bilirubiini häiritsevät menetelmää alentaen HbA_{1c}-mittaustuloksia, kun niiden pitoisuus on $\geq 20,0$ mg/dl (240 μ mol/l ja 342 μ mol/l). Valmistajan ilmoittama spesifisyys on esitetty taulukossa 5. [3.]

Taulukko 5. Entsymaattisen Architect c8000 HbA_{1c}-menetelmän spesifisyys.

Näytetaso	38,78–53,00 mmol/mol tai 5,7–7,0 % HbA _{1c}	> 53 mmol/mol tai > 7 % HbA _{1c}
IFCC-yksikkö	± 5 %	± 7 %
NGSP-yksikkö	± 3 %	± 5 %

Toistotarkkuus (Precision)

Valmistajan antama Hemoglobiini A_{1c}-menetelmän tarkkuus matalan tason näytteille (SD = Standard Deviation) ja laboratorion sisäinen toistettavuus (CV-%) normaalin ja korkean pitoisuuden näytteille on esitetty taulukossa 6. [3.]

Taulukko 6. Laboratorion sisäinen toistettavuus kolmella eri näytetasolla.

Näytetaso (mmol/mol HbA _{1c})	< 38,78	38,78–53,00	> 53,00
Laboratorion sisäinen CV-%	SD $\leq 1,42$ mmol/mol HbA _{1c}	≤ 3 %	$\leq 5,0$ %
Näytetaso (% HbA _{1c})	< 5,7	5,7–7,0	> 7,0
Laboratorion sisäinen CV-%	SD $\leq 0,13$ % HbA _{1c}	≤ 2 %	$\leq 3,5$ %

Menetelmävertailu

Verratessa Architectin Hemoglobiini A_{1c}-menetelmää NGSP:n sekundääriseen referenssilaboratoriomenetelmään, kulmakerroin oli $1,00 \pm 0,10$ ja korrelaatiokerroin (r) $\geq 0,95$ läpi koko mitta-alueen. Menetelmien välinen ennustettu poikkeama on ≤ 5 % (42,06, 47,53 ja 53,00 mmol/mol) ja ≤ 3 % (6,0, 6,5, ja 7,0 % HbA_{1c}). [3.]

3.4 Validointisuunnitelma

Validoinnissa sovellettiin seuraavia ohjeita: THL:n analyttisen biokemian laboratorion oma validointiohje [50], IUPAC:n Harmonized Guidelines for Single-Laboratory validation of Methods of Analysis [51], NCCLS:n Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline [52] sekä NCCLS:n Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline [53]. Validointi oli

niin kutsuttu yhden laboratorion validointi [51, s. 838], jonka tarkoituksena oli osoittaa ja varmistaa, että uusi entsyymaattinen HbA_{1c} -menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseensa ja sillä saadut tulokset ovat luotettavia ja tarkkoja. Validoinnin soveltamisalana ovat tuoreista tai pakastetuista kokoverinäytteistä tehtävät HbA_{1c}-analyysit. Validoitu näytepitoisuusalue oli noin 21–114 mmol/mol HbA_{1c} (uudella menetelmällä mitattuna), menetelmän mittausalue on 20,22–140,45 mmol/mol HbA_{1c}.

Menetelmä on jo valmistajan validoima ja NGSP-sertifioima [47], joten validointiasteena ei ollut täydellinen laajamittainen validointi, vaan uuden kaupallisen menetelmän toimivuuden tarkistus/osoitus [51, s. 838–844] myös analyttisen biokemian laboratoriossa. Ennen validointia laadittiin validointisuunnitelma (liite 1), jossa on kuvattu tarkemmin validoinnin toteutus ja mitattavat ominaisuudet. Tyypillisiä analyttisten menetelmien suorituskyykyyn liittyviä ominaisuuksia ovat sovellettavuus, selektiivisyys, herkkyys, kalibrointi, oikeellisuus, toistettavuus, toteamis- ja määritysrajat, mittausalue, saanto, häiriönkestävyys sekä mittausepävarmuus. Mittausepävarmuus on tärkeä indikaattori muun muassa siitä, missä määrin menetelmän suorituskyyky vastaa annettuja kriteerejä ja kuinka luotettavia analyysitulokset ovat [51, s. 839]. Tässä validoinnissa tutkittiin menetelmän tarkkuutta eli oikeellisuutta ja toistotarkkuutta, menetelmän lineaarisuutta ja hemolysaattinäytteiden säilyvyyttä sekä laskettiin menetelmälle mittausepävarmuusarvio. Valmistaja on määrittänyt menetelmälle toteamisrajat ja mittausalueen sekä tutkinut spesifisyyttä ja häiriönkestävyyttä, joten näitä ei enää tässä työssä erikseen testattu. Validoinnissa saatuja tuloksia verrattiin Labqualityn tarkkuusvaatimuksiin sekä valmistajan antamiin suorituskyykyä kuvaaviin kriteereihin.

Menetelmävertailussa tutkitaan kahden samaa analyttiä mittaavan menetelmän välisen tulosten poikkeamaa. Ideaalissa tapauksessa uutta menetelmää verrattaisiin referenssimenetelmään, mutta käytännössä komparatiivisena menetelmänä käyttäjän tekemässä validoinnissa on yleensä käytössä oleva rutiinimenetelmä. Vertailun tarkoituksena on selvittää, antavatko kaksi menetelmää toisiaan vastaavia tuloksia ja voidaananko uudella menetelmällä korvata nykyinen menetelmä. Poikkeaman suuruutta arvioidaan eri analyttipitoisuuksilla ja tuloksia analysoidaan yleensä esimerkiksi lineaarisen regressioanalyysin avulla. [52, s. 1–2.]

Tässä validoinnissa uuden menetelmän kahta eri sovellusta eli automaattista kokoverisovellusta ja manuaalista esikäsittelyä eli hemolysaattisovellusta verrattiin laboratoriossa rutiinikäytössä olevaan vanhaan immunoturbidimetrisen HbA_{1c}-menetelmään. Näy-

teaineisto koostui kertaalleen analysoiduista, pakastetuista väestöprojektinäytteistä. Näytteitä oli 100 kpl ja ne edustivat neljää eri kansallisuusryhmää. Näytteitä pyrittiin saamaan koko menetelmän mittausalueelta. Tavoitteena oli selvittää, onko uuden ja vanhan menetelmän välillä suurempi ero analysoidessa jonkin tietyn kansallisuusryhmän verinäytteitä, joissa erityisesti immunologista mittausta häiritsevän hemoglobiнопатian esiintymistodennäköisyys on suurempi.

Validointityön aikana käytettiin 5.6.2013 kalibroituja Finnpipettejä F1 (Thermo Scientific): 1–10 µl, 100–1000 µl ja 0,5–5 ml. Kalibraattoripullot punnittiin 31.10.2012 kalibroidulla Mettler AE 100 (GWB) -analyysivaa’alla. Architect c8200 -analysaattorille oli suoritettu akkreditointimittaukset 14.2.2013 ja viimeisin määraaikaishuolto 16.7.2013. Tulosten analysoinnissa käytettiin Microsoftin Excel-ohjelmaa.

4 Validointityö ja tulokset

4.1 Reagenssit ja välineet

HbA_{1c}-menetelmässä käytetään kaupallisia (Abbott Laboratories) Architect-analysaattorille tarkoitettuja, käyttövalmiita, kolmesta nestemäisestä reagenssista koostuvia reagenssikittejä (REF 4P52-21). Yhdellä kitillä voidaan suorittaa noin 300 testiä. Reagenssien reaktiivinen sisältö on kerrottu taulukossa 7. Lisäksi reagenssit sisältävät stabilointi- ja säilöntäaineita, kuten natriumatsidia (R1), ProClin 300 (R1 ja A1_cDIL) ja ofloksasiinia (R2). [3, s. 1.]

Taulukko 7. Menetelmässä käytettävät reagenssit ja niiden reaktiivinen sisältö.

Reagenssit	Reaktiivinen sisältö	Pitoisuus
Reagenssi 1 (R1)	10- (karboksimeetyyliaminokarbonyyli) - 3,7-bis (dimetyyliamino) fenotiatsiini natriumsuola	0,000817 %
	proteaasi	< 1 mU/dl
Reagenssi 2 (R2)	peroksidaasi	5–15 kU/dl
	fruktosyyli-peptidi-oksidaasi	300–900 U/dl
Diluentti (A1 _c DIL)	natriumnitriitti	> 0,05 – < 0,3 %

Menetelmän molemmat sovellukset kalibroidaan samalla 2-pisteen Hemoglobiini A_{1c} -kalibraattorilla (REF 4P52-02). Kalibraattorit ovat jäljitettävissä NGSP- ja IFCC-referenssimenetelmiin. Kalibrointi ja tulostaso varmistetaan käyttämällä kaupallisia ja

laboratorion omia kontrolleja. Hemolysaattisovelluksessa käytetään kahden tason kaupallisia kontrolleja (REF 4P52-10). Kokoverisovelluksessa käytetään omia kahden tason kokoverikontrolleja. Analysaattorin näyteneulan on oltava menetelmälle soveltuva (tuotenro 01G48-04). Hemolysaattisovellusta varten tarvitaan kalibroituja, säädettäviä automaattipipettejä, joilla voidaan mitata 10 µl:n ja 222 µl:n tilavuuksia. [3, s. 1–2.]

Menetelmä soveltuu kokoverinäytteille, jotka on kerätty muoviputkiin standardiverinäytteenottomenetelmiä käyttäen. Hyväksyttäviä antikoagulantteja näyteputkissa ovat litium- ja natriumhepariini, EDTA K₂, natriumfluoridi/Na₂ EDTA tai EDTA K₃. Verinäytteenotossa noudatetaan näyteputkivalmistajan ohjeita. Näyteputkia ei saa täyttää liian täyteen. Jos putken nestekorkeus ylittää 78 mm, analysaattori ei pysty suorittamaan analyysiä. Tällaisessa tapauksessa ylitäytetystä putkesta pipetoidaan 600 µl näytettä kartiopohjaiseen polypropyleeniputkeen. Jos näytetilavuus on > 600 µl, käytetään kartiopohjaisia 12 x 75 mm polypropyleeniputkia (esim. Sarstedt REF 57.512) tai muita soveltuvia putkia, kuten esimerkiksi näytteen primäärisiä keräysputkia. Mikäli verinäytettä on 200–600 µl, voidaan käyttää vain kartiopohjaisia polypropyleeniputkia. Kokoverinäytteitä ei voida analysoida Architectin näytekupissa eikä alle 200 µl näytteitä voida analysoida kokoverisovelluksella lainkaan, vaan niistä on aina tehtävä manuaalisesti hemolysaatit. Hemolysaatit voidaan analysoida Architect-näytekupissa tai kartiopohjaisissa polypropyleeniputkissa. [3, s. 2–3.]

4.2 Näytteiden käsittely

Näytteitä ei saa sentrifugoida. Jos näytettä tarkastellessa havaitaan fibriinihiyytymiä tai partikkelimaisia ainesosia, poistetaan ne puhtaalla puuvillavanutikulla. Ennen näytteen syöttöä analysaattorille, näyte sekoitetaan huolellisesti, joko vorteksoimalla matalalla nopeudella tai kääntelemällä rauhallisesti 10 x ylös-alas. Pakastettujen näytteiden tulee olla täysin sulia ennen sekoitusta. Näytteisiin ei saa jäädä näkyviä kerrostumia, vaan sekoitusta jatketaan, kunnes näytteet ovat visuaalisesti homogeenisia. [3, s. 2.]

Automaattisella kokoverisovelluksella näytteet voidaan sekoituksen jälkeen analysoida sellaisenaan. Näyteneula pipetoi näytteen putken pohjalta. Manuaalista hemolysaattisovellusta käytettäessä näytteet esikäsitellään hemolysaateiksi pipetoimalla ensin 222 µl A1_c-diluuttia putkeen, johon lisätään 10 µl kokoverinäytettä. Sekoituksen ja vähin-

tään minuutin seisotuksen jälkeen hemolysaatit voidaan syöttää analysaattorille. [3, s. 3.]

4.3 Kalibrointi

Uusi entsyymaattinen HbA_{1c}-menetelmä kalibroitiin 3.10.2013. Molemmat sovellukset kalibroitiin yhtäaikaaisesti samalla Abbottin kahden pisteen kalibraattorisetillä (Lot 44129UQ05), jonka ensimmäinen kalibraattori on ”blankki”. Kalibraattorien HbA_{1c}-pitoisuus: CAL 1: 3,78 µmol/l; CAL 2: 16,14 µmol/l. Kalibraattorien THb-pitoisuus: CAL 1: 101,6 µmol/l; CAL 2: 150,4 µmol/l. Annetuissa kalibraattoriarvoissa on huomioitu menetelmässä tehtävät laimennokset ja muut menetelmäparametrit (näytelaimennossuhde 1:23,22). [54.] Kalibraattorit liuotettiin 1,6 ml:aan laboratoriolaatuista vettä ($m_1 = 1,6115$ g, $m_2 = 1,6090$ g) ja ajettiin kartiopohjaisissa putkissa. Kalibrointisuorat ovat liitteenä 2. Kalibroinnin jälkeen ajettiin kontrolleja kalibrointitason varmistamiseksi. Kokoverisovelluksella (Wholeblood = WB) ajettiin Bioclinin lyofilisoidut (liuotus 500 µl:aan H₂O) kahden eri diabeettisen tason kokoverikontrollit (Lot 14D ja Lot 15D) sekä laboratorion oma pakastettu normaalia tasoa edustava JS-kokoverikontrolli.

Hemolysaattisovelluksella (Hemolysate = HEM) ajettiin samat kontrollit sekä lisäksi vanhaan menetelmään kuuluvat Abbottin kahden tason lyofilisoidut kontrollit (REF 2K96-10) CL1 (Lot 271926) ja CL2 (Lot 271927). Bioclinin kontrollit jäivät annetun pitoisuustavoitevälin alapuolelle. CL1-kontrollin tulos puolestaan oli valmistajan ilmoittaman tavoitevälin ylärajalla, mutta CL2 oli keskiarvoa matalammalla tasolla. JS-kontrollista saatiin lähes samaa tulostasoa (35,9 mmol/mol) kuin vanhalla menetelmällä (vuoden 2013 ka 35,7 mmol/mol, SD 1,3 mmol/mol). Kontrollitulokset olivat samaa luokkaa molemmilla sovelluksilla. Uuden menetelmän Abbottin kahden tason (L- ja H-taso) lyofilisoidut (liuotus 1 ml:aan H₂O) kontrollit (Lot 44130UQ05) tulivat 4.10.2013. Myös nämä ajettiin vielä ennen oikeellisuustestausta ja niiden mukaan saatu tulostaso oli hyvin kohdallaan. Kaikki kontrollitulokset on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. Kalibroinnin varmistamiseksi ajetut kontrollitulokset mmol/mol- ja %-yksiköissä.

Kontrolli	Sovellus	HbA _{1c} (mmol/mol)	Tavoiteväli (mmol/mol)	HbA _{1c} (%)	Tavoiteväli (%)
JS	WB	35,9	31–39	5,4	4,9–5,7
14D	WB	92,1	95–122	10,6	10,9–13,3
15D	WB	52,9	60–74	7,0	7,5–9,1
JS	HEM	35,9	31–39	5,4	4,9–5,7
14D	HEM	94,0	95–122	10,8	10,9–13,3
15D	HEM	54,3	60–74	7,1	7,5–9,1
CL1	HEM	41,5	27–41	6,0	4,4–6,4
CL2	HEM	83,3	73–101	9,8	8,8–11,8
L-taso	HEM	38,1	31–44	5,6	5,0–6,2
H-taso	HEM	88,4	70–103	10,2	8,6–11,5

Koska kalibroinnilla on suuri merkitys tulostasolle, pyrittiin sen vaikutusta tasaamaan suorittamalla validoinnin aikana toinenkin kalibrointi. Uusi kalibrointi tehtiin 16.10.2013 (liite 2). Liuotettiin uudet kalibraattoripullot ($m_1 = 1,6032$ g, $m_2 = 1,6081$ g) ja kontrollit, mutta lot-numerot säilyivät samoina kuin ensimmäisessä kalibroinnissa. Validointiaikana ei ollut käytettävissä kuin yhtä ja samaa kalibraattori- ja kontrollierää, mikä voi johtaa todellisen pitkäaikaisen kokonaistoistettavuuden yliarviointiin [53, s. 4].

JS-kontrollin taso oli toisenkin kalibroinnin jälkeen hyvä, samoin L- ja H-tason hemolysaattikontrollien tasot (taulukko 9). Bioclinin kontrollit (14D ja 15D) jäivät tavoitevälin alapuolelle kuten myös vanhan menetelmän CL1-kontrolli. Lyofilisoidut kontrollit eivät ilmeisesti sovellu uudelle menetelmälle, vaan niiden tulostaso on selkeästi matalampaa kuin aiemmin. Tästä havainnosta syntyi tarve uusille kokoverikontrolleille. Henkilökunnan sisältä löydettiin sopivat HbA_{1c}-tasot, normaali (n. 5,2 % A1c) ja diabeettinen taso (n. 8,8 % A1c). Näiltä henkilöiltä otettiin 10 EDTA-näyteputkellista (n. 90 ml) verta, jotka poolattiin yhteen dekkaan ja jaettiin magneettisekoituksessa kerta-annosputkiin. Putket pakastettiin (–70 °C) ja niitä käytetään tulevaisuudessa laboratorion uusina sisäisinä HbA_{1c}-kontrolleina.

Taulukko 9. Toisen kalibroinnin varmistamiseksi ajettut kontrollitulokset mmol/mol- ja %-yksiköissä.

Kontrolli	Sovellus	HbA _{1c} (mmol/mol)	Tavoiteväli (mmol/mol)	HbA _{1c} (%)	Tavoiteväli (%)
JS	WB	35,3	31–39	5,4	4,9–5,7
14D	WB	92,0	95–122	10,6	10,9–13,3
15D	WB	52,5	60–74	7,0	7,5–9,1
JS	HEM	35,4	31–39	5,4	4,9–5,7
14D	HEM	93,0	95–122	10,7	10,9–13,3
15D	HEM	53,1	60–74	7,0	7,5–9,1
CL1	HEM	25,7	27–41	4,5	4,4–6,4
CL2	HEM	78,8	73–101	9,4	8,8–11,8
L-taso	HEM	38,4	31–44	5,7	5,0–6,2
H-taso	HEM	87,9	70–103	10,2	8,6–11,5

4.4 Toistettavuus

Toistettavuudella (Precision) tarkoitetaan määrätyissä olosuhteissa saatujen toisistaan riippumattomien testitulosten keskinäistä yhtäpitävyyttä [51, s. 848]. Tulosten toistettavuuteen vaikuttavia tekijöitä ja vaihtelua synnyttäviä lähteitä ovat laitteen toimintakyvyn lisäksi muun muassa erien väliset kalibraattori- tai reagenssierot, henkilöiden/operaattorien väliset erot, näytteiden käsittelyvaihe, näytemateriaalin stabiilisuus ja heterogeenisuus, laboratorioympäristöolosuhteet (lämpötila), mahdollinen siirtymävirhe ja ryömintä (drift) [51, s. 841; 53, s. 4]. Toistettavuus vaihtelee usein pitoisuuden suhteen [51, s. 849]. Menetelmän kokonaistoistotarkkuus pitää sisällään sarjan sisäiset, sarjojen väliset, päivän sisäiset ja päivien väliset toistettavuuteen liittyvät tekijät [53, s. 4].

4.4.1 Esi-toistotarkkuus

Kalibroinnin jälkeen (3.10.2013) ajettiin kolmesta eri näytteestä 10 toistomittausta niin sanottuna esi-toistotarkkuustestinä (Preliminary Precision Test), jotta nähtäisiin, voidaanko edetä varsinaiseen validointiin vai onko menetelmässä jokin sarjan sisäiseen toistettavuuteen liittyvä ongelma. Tätä testiä ei pitäisi käyttää varsinaisessa sarjan sisäisen toistettavuuden arvioinnissa, koska tällöin olisi merkittävä riski siitä, että yksittäinen analysointikerta ei kuvastaisikaan normaaleja operointiparametreja. Sarjan si-

säisen toistettavuuden arvionti suositellaan tehtäväksi ”poolaamalla” yhteen useiden eri ajojen suorituskyyky. [53, s. 1–4.]

Esitestauksessa ajatut näytteet olivat laboratorion oma sisäinen pakastettu kokoveri-kontrolli JS, samana päivänä otettu tuore kokoverinäyte sekä Bioclinin diabeettisen tason lyofilisoitu kokoverikontrolli Lot 14D. Toistot suoritettiin molemmilla sovelluksilla (WB, HEM). Tulosten perusteella toistettavuus oli erittäin hyvä ja jäi reilusti alle valmistajan antamien kriteerien (ks. taulukko 6), eikä ongelmia siis havaittu. Tuorenäytteellä oli suurin CV-%, mutta sekin jäi alle yhden prosentin. Tulokset on esitetty taulukossa 10.

Taulukko 10. Laboratorion sarjan sisäinen toistettavuus (CV-%) määritettynä kolmesta näytteestä (10 toistoa/näyte), tulosten keskiarvot ja keskihajonnat (SD).

Näyte	Sovellus	Keskiarvo HbA _{1c} (mmol/mol)	SD HbA _{1c} (mmol/mol)	CV- %	Keskiarvo HbA _{1c} (%)	SD HbA _{1c} (%)	CV- %
tuorenäyte	WB	33,0	0,3	1,0	5,17	0,03	0,6
tuorenäyte	HEM	33,9	0,2	0,6	5,25	0,02	0,4
JS	WB	35,4	0,2	0,5	5,39	0,02	0,3
JS	HEM	35,8	0,2	0,5	5,43	0,02	0,3
14D	WB	93,8	0,5	0,6	10,73	0,05	0,4
14D	HEM	94,7	0,4	0,4	10,81	0,04	0,3

4.4.2 Yksilöllisen kädenjäljen vaikutus

Yksilöllisen kädenjäljen vaikutusta näytteiden esikäsittelyvaiheessa ja sitä kautta myös menetelmän häiriökestävyyttä tutkittiin analysoimalla 20 samaa näytettä kahden eri henkilön tekeminä hemolysaatteina. Näytteet ajettiin peräkkäin. Tulokset olivat keskenään hyvin toistettavia, HbA_{1c}:n (mmol/mol) CV-% oli 0,3 ja % A1c:n CV-% oli 0,2. Varianssien välistä eroa tutkittiin MS Excel -ohjelman kaksisuuntaisella ($\alpha/2 = 0,025$) F-testillä (F-Test Two-Sample for Variances). Nollahypoteesina oli varianssien yhtäsuuruus ja vaihtoehtoisena hypoteesina se, että varianssit olisivat erisuuret. Nollahypoteesia ei hylätty, F-arvot olivat noin yksi: mmol/mol A1c -tuloksissa 1,0006 ja % A1c-tuloksissa 1,0005. F-arvot olivat pienemmät kuin kriittinen arvo 2,526 ja p-arvo 0,999 oli $> 0,025$, eli varianssien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa.

Kahden otoksen kaksisuuntaisen t-testin (t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances) avulla tutkittiin, saako kaksi henkilöä toisistaan merkitsevästi eroavia tuloksia. Tulosten keskiarvoissa (taulukko 11) ei 95 %:n merkitsevyystasolla ollut eroa.

Taulukko 11. Kahden otoksen t-testi, yhtä suuret varianssit. Tulokset sekä mmol/mol - että %-HbA_{1c} -yksiköissä.

	HbA _{1c} (mmol/mol)		HbA _{1c} (%)	
	Henkilö 1	Henkilö 2	Henkilö 1	Henkilö 2
Mean	45,61	45,58	6,33	6,32
Variance	302,30	302,12	2,53	2,53
Observations	20	20	20	20
Pooled Variance	302,21		2,53	
Hypothesized Mean Difference	0		0	
df	38		38	
t Stat	0,006		0,006	
P(T<=t) one-tail	0,498		0,498	
t Critical one-tail	1,686		1,686	
P(T<=t) two-tail	0,995		0,995	
t Critical two-tail	2,024		2,024	

4.4.3 Sisäinen uusittavuus

Analyysimenetelmän ja laboratorion sisäistä uusittavuutta tutkittiin analysoimalla sekä hemolysaatti- että kokoverimenetelmällä kolmen eri tason kontrollinäytteistä rinnakkais-tulokset kerran päivässä vähintään 10 päivän ajan. Minimisuosituksena pidetään 20 analysointipäivää [53, s. 1–2], mutta nyt jouduttiin tyytymään tätä lyhyempään aikaan. Kontrollitulosten keräystä jatketaan menetelmän käyttöönoton aikana. Testattavien materiaalien tulisi simuloida oikeiden kliinisten näytteiden ominaisuuksia [53, s. 5]. Käytettävissä oli vain yksi aito kokoverikontrolli (JS), muut analysoidut kontrollit olivat kaupallisia lyofilisoituja kontrolleja, jotka eivät täysin vastaa oikeita potilasnäytteitä. Referenssimateriaalit ovat usein pitkälti homogenisoituja ja saattavat siten johtaa variaation aliarviointiin [51, s. 849].

Tulosten tilastollisessa käsittelyssä käytettiin Excel-ohjelman valmista yksisuuntaista varianssianalyysityökalua ja F-testiä (Anova Single Factor). Tuloksista laskettiin estimaatti sarjan sisäisestä keskihajonnasta (S_{wr} , kaava 1), päivittäisten keskiarvojen keskihajonta (B , kaava 2), estimaatit sarjojen/päivien välisestä keskihajonnasta (S_{dd} , kaava 3) sekä määritysten kokonaiskeskihajonnasta eli laboratorion sisäisestä uusittavuudesta (S_T , kaava 4). Kun päivän aikana suoritetaan vain yksi ajo, jossa analysoidaan näyt-

teestä rinnakkaistulokset, ei sarjojen tai päivien välisiä toistettavuuteen liittyviä komponentteja voida erottaa toisistaan. Tällöin "B" mittaa näiden kahden osatekijän summaa ja S_{dd} kuvastaa päivien välisten ja päivän sisäisten sarjojen välisten vaikutusten summaa. Estimaatit on laskettu seuraavien kaavojen 1–4 avulla. [53, s. 23–26.]

$$S_{wr} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^I (x_{i1} - x_{i2})^2}}{2I} \quad (1)$$

I on päivien kokonaislukumäärä
 x_{i1} on 1. replikaatin tulos päivänä i
 x_{i2} on 2. replikaatin tulos päivänä i .

$$B = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^I (\bar{X}_i - \bar{X}_{..})^2}}{I - 1} \quad (2)$$

I on päivien lukumäärä
 \bar{X}_i on päivän i replikaattien keskiarvo
 $\bar{X}_{..}$ on kaikkien päivien kaikkien tulosten keskiarvo.

$$S_{dd} = \sqrt{B^2 - \frac{S_{wr}^2}{N}} \quad (3)$$

B on päivittäisten keskiarvojen keskihajonta
 S_{wr}^2 on sarjan sisäisen varianssin (keskihajonnan neliö) estimaatti
 N on replikaattien lukumäärä yhdessä ajossa.

$$S_T = \sqrt{B^2 + \frac{N-1}{N} S_{wr}^2} \quad (4)$$

ks. symbolien selitykset kaava 3.

F-testin oletuksena on, että eri päivinä mitatuilla tuloksilla ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, ja tällöin laskettu F-testisuure on pienempi kuin kriittinen F-arvo. Tässä tapauksessa kaikki lasketut F-suureet olivat suurempia kuin kriittinen arvo eli päivien välisillä variansseilla oli tilastollisesti merkitsevä ero. L- ja H-tason sekä 15D-kontrollien kriittiset F-arvot olivat 3,0 (df = 9), JS- ja 14D-kontrollin 2,9 (df = 10). Tulosten vaihteluväli ja suhteelliset keskihajonnat olivat kuitenkin hyvin pieniä, ≤ 3 %. Lyofilisoidut kontrollit säilyvät liuotettuina jääkaapissa 7–10 vrk. Näiden näytteiden pitoisuudet nousevat hiljalleen säilytysaikana, mikä osaltaan johtaa päivien väliseen vaihteluun. Laboratorion

sisäinen toistettavuus oli hyvin valmistajan antamissa rajoissa (ks. taulukko 6). Taulukkoon 12 on koottu toistettavuustestaukseen liittyvät tulokset.

Taulukko 12. Laboratorion sisäinen uusittavuus. Kontrollinäytteiden HbA_{1c} (mmol/mol) -tulosten vaihteluväli, keskiarvot ja lasketut keskihajontaestimaatit sekä F-testiarvot.

Kontrolli	Sovellus	Vaihteluväli (mmol/mol)	Keskiarvo (mmol/mol)	CV-%	S _{wr}	B	S _{dd}	S _T	F-arvo
L-taso	HEM	37,5–38,6	38,0	0,8	0,2	0,3	0,3	0,3	6,5
H-taso	HEM	87,3–89,0	88,2	0,5	0,3	0,4	0,4	0,5	4,4
JS	HEM	35,2–36,2	35,9	0,8	0,2	0,3	0,2	0,3	4,5
JS	WB	35,3–36,1	35,5	1,1	0,2	0,4	0,3	0,4	9,1
15D	WB	55,3–58,0	56,6	3,0	0,3	1,7	1,7	1,8	87,2
14D	WB	91,9–97,4	96,0	1,8	0,4	1,8	1,8	1,8	40,8

HEM-sovelluksella sarjan sisäinen ka CV oli 0,4 %, sarjojen/päivien välinen ka CV 0,6 % ja kokonaistoistettavuuden ka CV 0,7 %. WB-sovelluksella sarjan sisäinen ka CV oli 0,5 %, sarjojen/päivien välinen ka CV 2,0 % ja kokonaistoistettavuuden ka CV 2,0 %. Vrt. vanhan menetelmän sarjan sisäinen (%-yksikköisten tulosten) CV on noin 1,1 % ja sarjojen välinen CV noin 3,0 %.

4.4.4 Siirtymävirhe

Siirtymävirhettä (Carryover) korkean tason näytteestä matalan tason näytteeseen tutkittiin analysoimalla (9.10.2013) kokoverisovelluksella ensin kolmeen kertaan peräkkäin kokoverinäyte, jossa oli korkea HbA_{1c}-pitoisuus (H₁, H₂, H₃), ja heti perään kolme kertaa näyte, jossa oli matala pitoisuus (L₁, L₂, L₃). Taulukossa 13 on esitetty näytteiden mitaustulokset.

Taulukko 13. Siirtymävirhetestauksen HbA_{1c}-tulokset sekä mmol/mol- että %-yksiköissä.

Näyte	HbA _{1c} (mmol/mol)	HbA _{1c} (%)
H ₁	91,5	10,5
H ₂	91,6	10,5
H ₃	91,9	10,6
L ₁	25,8	4,5
L ₂	25,7	4,5
L ₃	26,0	4,5

Siirtymävirhe-% laskettiin kaavalla 5 [55, s. 4–7]:

$$\text{Siirtymävirhe-\%} = (L_1 - L_3) / (H_3 - L_3) \times 100 \% = -0,40 \%. \quad (5)$$

Siirtymävirhettä ei täten havaittu tutkituilla konsentraatitasoilla. Arvoissa näkyi ainoastaan mittaustulosten normaalia satunnaisvaihtelua.

Näyteneulan mahdollista kontaminoitumista kokoverinäytteistä testattiin (29.10.2013) ajamalla kokoverinäytteiden välissä seerumikontrollinäytteitä. Uuden kokoverimenetelmän myötä analysaattorille tehdään HbA_{1c}-analyysyjä seuraavana aamuna huollon (Daily Maintenance) yhteydessä näyteneulan manuaalinen pyyhintä detergentti A - pesuliuksella. Analysaattori pesee näyteneulaa myös jatkuvasti ajon aikana (Smart wash: maximum wash protocol). Ajossa olleissa seerumikontrollituloksissa (Apo A-I, Apo B, Ca, Chol, CrEnz, Gluc, Trig, U-HDL ja UA), ei havaittu poikkeavia tasomuutoksia. Tulosten perusteella olisi mahdollista analysoida samana päivänä sekä kokoveri-että seerumi-/plasmanäytteitä.

4.5 Oikeellisuus

Oikeellisuudella tarkoitetaan mitatun analyysituloksen ja hyväksytyn referenssiarvon "läheisyyttä". Oikeellisuus ilmaistaan kvantitatiivisesti poikkeama-termillä (Bias). Mitä pienempi poikkeama on, sitä parempi on tulosten oikeellisuus. Oikeellisuutta tutkittaessa verrataan menetelmän antamaa vastetta referenssimateriaaliin, jolla on tunnettu pitoisuus ja sille määritetty mittausepävarmuus. Sertifioituja referenssimateriaaleja ei aina ole käytettävissä, ja tällöin voidaan käyttää esimerkiksi ulkoisilta laadunvalvontakierroksilta yli jääneitä materiaaleja. Vaikka näille materiaaleille annettujen arvojen mittausepävarmuus saattaa olla kyseenalainen, voidaan niiden avulla joka tapauksessa suorittaa yleinen poikkeaman tarkistus. [51, s. 842–847.]

Oikeellisuutta testattiin (4.10.2013) ajamalla ulkoisia laaduntarkkailunäytteitä Labqualityn vuoden 2013 Hemoglobiini A1c -kierroksilta 1, 2, 4 ja 5. Joka kierroksella lähetetään kaksi eri tason EDTA-kokoverinäytettä, joille referenssilaboratorio ERLGH on määrittänyt IFCC (mmol/mol) - ja DCCT (%) -tavoitearvot. Lisäksi lähetetään kaksi lyofilisoitua näytettä. EDTA-näytteet (6 kpl) ajettiin rinnakkaisina molemmilla sovelluksilla. Lisäksi ajettiin lyofilisoidut näytteet (6 kpl) yhteen kertaan. Lukuun ottamatta kierrosta 5, näytteet olivat kertaalleen analysoituja ja siten myös lyofilisoidut näytteet valmiiksi liuotettuja. Näytteitä oli säilytetty –20 °C:ssa.

Taulukossa 14 on esitetty näytteiden 1 ja 2 (S001 ja S002) poikkeamat (Bias-%) IFCC-referenssiarvoista. Kierroksella 2/2013 tulokset olivat hieman matalammat kuin referenssiarvot, kierroksilla 1 ja 4 korkeammat [42–44]. Kierroksella 5/2013 [56] näytteen 1 poikkeama oli negatiivinen, näytteen 2 positiivinen. Labqualityn tarkkuusrajaan ± 10 % verrattuna tulokset olivat erittäin hyvät. Tulokset jäivät myös valmistajan antamien tarkkuusrajojen alapuolelle, ± 5 % pitoisuustasolla 38,78–53,00 mmol/mol HbA_{1c} ja ± 7 % tasolla $> 53,00$ mmol/mol HbA_{1c} (taulukko 6). Kokoveri- ja hemolysaattisovellusten välillä oli poikkeamissa pientä (~ 1 %) vaihtelua. Manuaalisella esikäsittelysysteemillä eli hemolysaattisovelluksella saadut tulokset olivat hieman korkeampia kuin automaattisella kokoverisovelluksella saadut.

Taulukko 14. Labqualityn vuoden 2013 HbA_{1c}-kierrosten EDTA-näytteiden (S001 ja S002) omien analyysitulosten (ka) poikkeamat IFCC-referenssiarvoista (mmol/mol).

Labqualityn Hemoglobiini A1c -kierros	Sovellus	Oma tulos (mmol/mol) S001	IFCC S001	Bias-% S001	Oma tulos (mmol/mol) S002	IFCC S002	Bias-% S002
1/2013	WB	53,7	52,6	2,1	72,9	71,9	1,4
1/2013	HEM	54,0	52,6	2,6	73,8	71,9	2,7
2/2013	WB	54,8	55,1	-0,5	32,0	33,2	-3,7
2/2013	HEM	55,2	55,1	0,2	32,4	33,2	-2,5
4/2013	WB	46,8	44,8	4,4	41,0	40,1	2,1
4/2013	HEM	46,8	44,8	4,4	41,4	40,1	3,2
5/2013	WB	52,5	53,3	-1,6	75,0	74,3	1,0
5/2013	HEM	53,0	53,3	-0,5	75,7	74,3	1,8

Taulukossa 15 on esitetty näytteiden 1 ja 2 (S001 ja S002) tulokset DCCT-referenssiarvoihin verrattuna. Tulokset ovat samankaltaiset kuin IFCC-referenssiarvoihin verrattuna, mutta poikkeamat ovat pienemmät kuten %-yksikköisissä A1c-tuloksissa yleensäkin. Tulokset eivät ylittäneet valmistajan antamia tarkkuusrajoja ± 3 % pitoisuustasolla 5,7–7,0 % HbA_{1c} tai ± 5 % tasolla > 7 % HbA_{1c}.

Taulukko 15. Labqualityn vuoden 2013 HbA_{1c}-kierrosten EDTA-näytteiden (S001 ja S002) omien analyysitulosten (ka) poikkeamat DCCT-referenssiarvoista (% HbA_{1c}).

Labqualityn Hemoglobiini A1c -kierros	Sovellus	Oma tulos (%) S001	DCCT (%) S001	Bias-% S001	Oma tulos (%) S002	DCCT (%) S002	Bias-% S002
1/2013	WB	7,06	6,96	1,5	8,82	8,73	1,1
1/2013	HEM	7,09	6,96	1,9	8,91	8,73	2,0
2/2013	WB	7,17	7,19	-0,3	5,08	5,19	-2,2
2/2013	HEM	7,20	7,19	0,2	5,11	5,19	-1,5
4/2013	WB	6,43	6,25	2,9	5,90	5,82	1,3
4/2013	HEM	6,43	6,25	2,9	5,94	5,82	2,0
5/2013	WB	6,95	7,03	-1,1	9,02	8,95	0,8
5/2013	HEM	7,00	7,03	-0,4	9,07	8,95	1,4

Vanhan immunoturbidimetrisen HbA_{1c} -menetelmän oikeellisuus (ka Bias-%) DCCT-referenssiarvoihin verrattuna on vuosien 2005–2013 kaikki tulokset huomioiden -0,3 % (SD 7,3 %) ja vuosien 2011–2013 tulokset huomioiden 2,1 % (SD 6,5 %). Uuden entsymaattisen menetelmän keskiarvopoikkeamaa arvioitaessa Labqualityn kierrosnäytteet jaettiin kahteen pitoisuustasoon: ≤ 53 mmol/mol ja > 53 mmol/mol. Uuden hemolysaattimenetelmän keskiarvopoikkeama tähän mennessä saatujen tulosten valossa on 1,2 % (SD 3,2 %) matalammalla tasolla ja 1,8 % (SD 1,2 %) korkeammalla tasolla. Vastaavasti kokoverimenetelmässä keskiarvopoikkeama on matalammalla tasolla 0,3 % (SD 3,7 %) ja korkeammalla tasolla 1,0 % (SD 1,1 %).

Lyofilisoiduille näytteille ei ole käytettävissä referenssiarvoja, siksi tuloksia verrattiin kierroksella vastanneiden kaikkien tulostusryhmien keskiarvoihin. Lyofilisoitujen näytteiden 3 ja 4 (S003 ja S004) poikkeamat keskiarvoista olivat huomattavasti suuremmat kuin EDTA-näytteiden poikkeamat referenssiarvoista eikä Labqualityn tarkkuusraja (ka ± 10 %) täytynyt läheskään kaikissa näytteissä. Kaikki poikkeamat olivat negatiivisia eli tulostaso oli huomattavasti matalampi. Osittain tämä johtuneen myös lyofilisoitujen näytteiden EDTA-kokoverta huonommasta säilyvyydestä, näytteet eivät säily stabiileina liuotuksen jälkeen. Liuotettu lyofilisaatti säilyy jääkaappilämpötilassa noin 7 vrk. Taulukossa 16 on esitetty lyofilisoitujen näytteiden analysointitulokset kahdella eri sovelluksella (WB, HEM) ja tulosten poikkeamat kierroskeskiarvoista mmol/mol-yksikössä ilmaistujen tulosten osalta.

Taulukko 16. Labqualityn vuoden 2013 HbA1c-kierrosten lyofilisoitujen näytteiden (S003 ja S004) mmol/mol-yksikköisten tulosten poikkeamat kierroskeskiarvoista.

Labquality Hemoglobiini A1c -kierros	Sovellus	Oma tulos (mmol/mol) S003	Keskiarvo (mmol/mol) S003	Bias-% S003	Oma tulos (mmol/mol) S004	Keskiarvo (mmol/mol) S004	Bias-% S004
1/2013	WB	57,4	66,6	-13,9	99,3	107,3	-7,5
1/2013	HEM	59,4	66,6	-10,8	100,2	107,3	-6,6
2/2013	WB	32,9	40,0	-17,9	96,4	108,0	-10,8
2/2013	HEM	33,7	40,0	-15,7	98,4	108,0	-8,9
4/2013	WB	54,4	66,8	-18,5	95,0	109,1	-13,0
4/2013	HEM	56,0	66,8	-16,2	96,8	109,1	-11,3
5/2013	WB	32,3	39,7	-18,6	99,5	106,8	-6,8
5/2013	HEM	33,0	39,7	-16,9	100,5	106,8	-5,9

Taulukossa 17 on esitetty lyofilisoitujen näytteiden analysointitulokset kummallakin sovelluksella ja tulosten erotukset kierroskeskiarvoista %-yksiköissä ilmaistujen tulosten osalta.

Taulukko 17. Labqualityn vuoden 2013 HbA1c-kierrosten lyofilisoitujen näytteiden (S003 ja S004) %-yksikköisten tulosten poikkeamat kierroskeskiarvoista.

Labquality Hemoglobiini A1c -kierros	Sovellus	Oma tulos (%) S003	Keskiarvo (%) S003	Bias-% S003	Oma tulos (%) S004	Keskiarvo (%) S004	Bias-% S004
1/2013	WB	7,4	8,3	-11,2	11,2	12,2	-7,7
1/2013	HEM	7,6	8,3	-8,9	11,3	12,2	-7,0
2/2013	WB	5,2	5,8	-11,7	11,0	12,2	-10,4
2/2013	HEM	5,2	5,8	-10,3	11,2	12,2	-8,9
4/2013	WB	7,1	8,3	-13,8	10,8	12,2	-10,9
4/2013	HEM	7,3	8,3	-12,1	11,0	12,2	-9,5
5/2013	WB	5,1	5,9	-13,2	11,3	12,0	-6,0
5/2013	HEM	5,2	5,9	-12,1	11,3	12,0	-5,2

Kierroksella 5/2013 oli lyofilisoiduista näytteistä jätetty kolme Abbott Architect entsyymaattisen -tulostusryhmän vastausta. Verrattuna tähän oman tulostusryhmän keskiarvoon, saadut tulokset olivat hyvin samassa linjassa: näyte 3 oman tulostusryhmän ka 32,0 mmol/mol (5,0 % A1c) ja näyte 4 ka 98,5 mmol/mol (11,1 % A1c). [56.]

4.6 Näytteiden laimentaminen

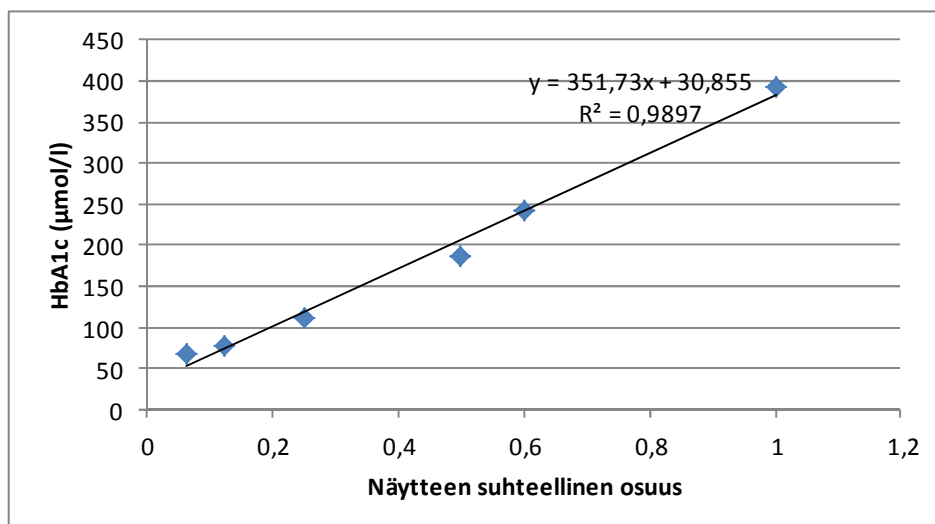
HbA_{1c}:n ja THb:n laimennosten lineaarisuutta testattiin (17.10.2013) tekemällä korkean analyyttipitoisuuden sisältävästä potilasnäytteestä (393,5 mmol/mol A1c, 12,7 % A1c) mahdollisimman hyvin koko mittausalueen kattava laimennossarja [49, s. 2]: $\frac{1}{1}$, $\frac{3}{5}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ ja $\frac{1}{16}$. Laimennukset tehtiin A1c-diluentilla. Periaatteessa näytteitä ei saisi laimentaa, koska analyysituloksella on laskennallinen suhde [3, s. 3]. Laimennoksista valmistettiin edelleen hemolysaatit pipetoimalla 10 µl kutakin laimennosta ja 222 µl A1c-diluenttia. Mittaukset tehtiin rinnakkaisina näytteinä.

Taulukossa 18 on esitetty mitatut ja oletetut HbA_{1c}- ja THb-tulokset. Suurimmasta laimennoksesta ei saatu mitattua THb-tulosta, koska pitoisuus oli liian pieni. Valmistajan ilmoittama THb:n lineaarisuusalue alkaa pitoisuudesta 296 µmol/l, ylärajaa ei ole. Menetelmän varsinainen lineaarinen mittausalue on annettu HbA_{1c}/THb-suhteelle (4,0–15,0 % HbA_{1c} tai 20,22–140,45 mmol/mol HbA_{1c}). HbA_{1c}/THb-suhde ei säilynyt laimennoksissa vakiona, vaan nousi nopeasti. Testauksenkaan perusteella näytteitä ei saisi laimentaa. Mikäli näytepitoisuus kuitenkin ylittää lineaarisen mittausalueen, ja näyte joudutaan laimentamaan A1c-diluentilla, laimennussuhde ei saisi olla suurempi kuin 1:2.

Taulukko 18. Laimennossarja. Mitatut (ka) ja oletetut HbA_{1c}- ja THb-arvot sekä laskennallinen HbA_{1c}-suhde (%).

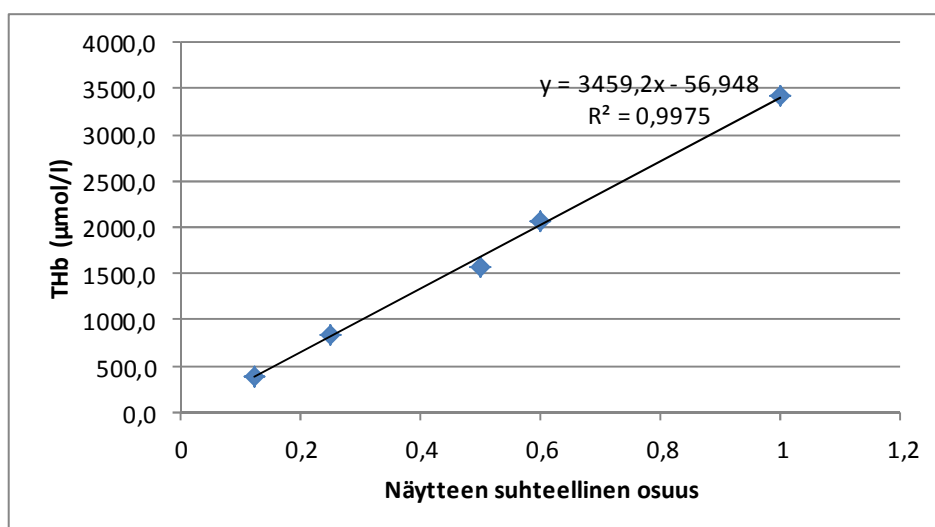
Laimennos-suhde	Mitattu HbA _{1c} (ka) (µmol/l)	Oletettu HbA _{1c} (µmol/l)	Mitattu THb (ka) (µmol/l)	Oletettu THb (µmol/l)	HbA _{1c} (%)
1:1	393,5	393,5	3421,2	3421,2	12,7
3:5	241,8	236,1	2060,1	2052,7	12,9
1:2	186,3	196,7	1567,8	1710,6	13,0
1:4	111,1	98,4	832,8	855,3	14,4
1:8	78,3	49,2	395,0	427,6	20,3
1:16	66,7	24,6	< 295,6	213,8	-

Mitatuista HbA_{1c}-tuloksista piirrettiin regressiokuvaaja (kuva 2). Pienillä pitoisuuksilla suora ei ollut lineaarinen, vaan lähti kaartumaan ylöspäin. Valmistajan ilmoittama HbA_{1c}-lineaarisuusalue alkaa pitoisuudesta 33 µmol/l, ylärajaa ei ole.



Kuva 2. Laimennosten HbA_{1c}-lineaarisuussuora.

Myös mitatuista THb-tuloksista piirrettiin regressiosuora (kuva 3), suora oli mitatulla alueella visuaalisesti lineaarinen.



Kuva 3. Laimennosten THb-lineaarisuussuora.

4.7 Lineaarisuus

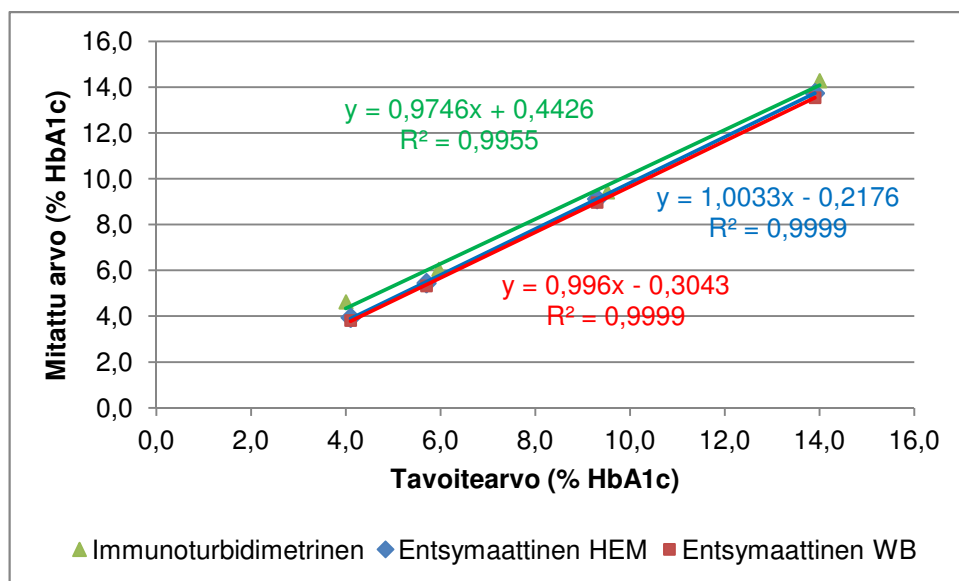
Hemoglobiini A1C -menetelmän lineaarisuutta testattiin (15.11.2013) kaupallisella Lyphochek Hemoglobin A1C Linearity Set -sarjalla (BIO-RAD: Lot 34650). Sarja koostuu neljän eri tason lyofilisoiduista humaaneista kokoverikontrolleista, joille on määritet-

ty menetelmäkohtaiset tavoitearvot. Mittaukset tehtiin vanhalla menetelmällä sekä molemmilla uusilla sovelluksilla (taulukko 19). Näytteet ajettiin rinnakkaisina.

Taulukko 19. Lineaarisuusmittaustulokset. Menetelmäkohtaiset HbA_{1c}-tavoitearvot (%) ja saadut tulokset vanhalla immuno- ja uudella entsyymaattisella HbA_{1c}-menetelmällä.

Taso	Immunoturbidimetrinen HbA _{1c} -menetelmä		Entsyymaattinen HbA _{1c} -menetelmä kokoverisovellus		Entsyymaattinen HbA _{1c} -menetelmä hemolysaattisovellus	
	Tavoite	Saatu (ka)	Tavoite	Saatu (ka)	Tavoite	Saatu (ka)
1	< 4	4,6	4,1	3,8	4,1	3,9
2	5,96	6,1	5,7	5,3	5,7	5,4
3	9,52	9,4	9,3	9,0	9,3	9,1
4	> 14	14,3	13,9	13,5	13,9	13,7

Uusi entsyymaattinen menetelmä oli kummallakin sovelluksella lineaarinen koko mittausalueella. Saadut tulokset jäivät hieman alle tavoitearvojen. Vanhalla immunoturbidimetrillä menetelmällä saatiin pienemmillä pitoisuuksilla tavoitearvoja korkeampia tuloksia. Kuvassa 4 on esitetty kaikkien menetelmien lineaarisuussuorat.

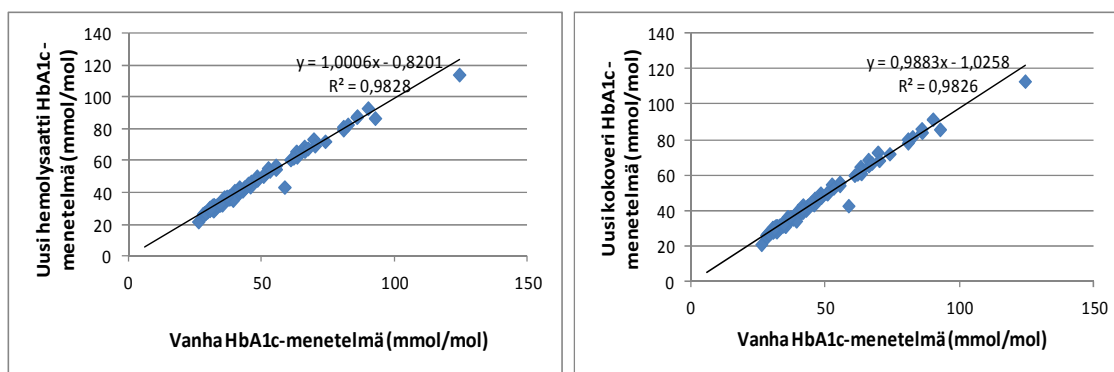


Kuva 4. Immunoturbidimetrinen HbA_{1c} -menetelmän ja entsyymaattisten HbA_{1c}-sovellusten lineaarisuusmittaussyorat. Huom. menetelmillä on eri tavoitearvot.

4.8 Menetelmävertailu

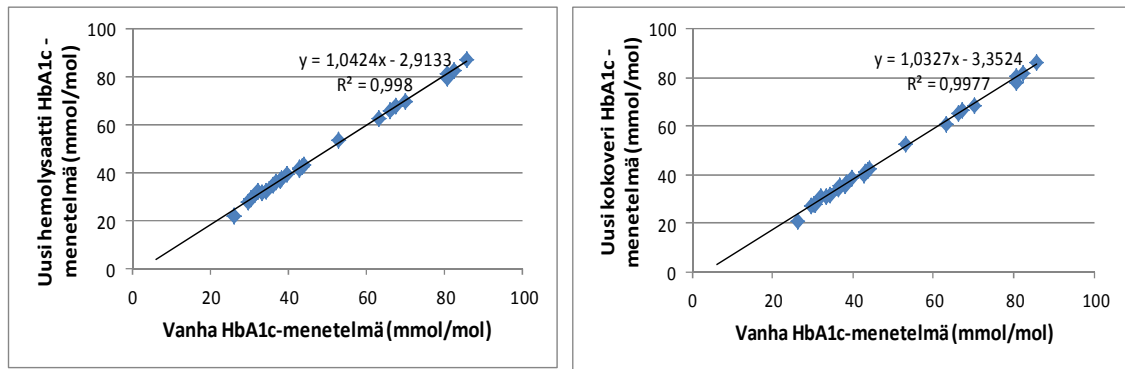
Menetelmävertailua suoritettiin 7.10.–18.10.2013 välisenä aikana viitenä eri päivänä. Neljästä eri kansallisuusryhmästä (suomalaiset, venäläiset, somalit ja kurdit) otettuja näytteitä analysoitiin yhteensä 100 kpl, 25 kpl/kansallisuus. Näytteet analysoitiin satunnaisessa poimintajärjestyksessä, 20 näytettä/pv. Analysoitujen näytteiden pitoisuusalue uudella menetelmällä oli noin 21–114 mmol/mol HbA_{1c}. Näytteet analysoitiin uudella hemolysaattimenetelmällä, uudella automaattisella kokoverimenetelmällä sekä vanhalta käytössä olevalla immunoturbidimetrisellä menetelmällä. Ennen näyteajoa ja näyteajon päätteeksi ajettiin jokaisesta menetelmästä omat kontrollinäytteet, joiden tuloksista pidettiin kirjaa. Ennen ajoa näytteiden annettiin sulaa huoneenlämmössä, minkä jälkeen ne sekoitettiin huolellisesti.

Tarkasteltiin ensin kaikkia kansallisuusryhmiä yhdessä ja piirrettiin mmol/mol HbA_{1c}-tuloksista regressiokuvaajat (kuva 5) pienimmän neliösumman menetelmällä. Suorien selitysasteet (R^2) olivat sekä hemolysaatti- että kokoverimenetelmissä noin 0,983. Regressiosuorien kulmakertoimet olivat lähellä yhtä, suorat leikkasivat y-akselin origon alapuolella. Kummatkin uudet menetelmät antoivat vanhaa menetelmää matalampia tuloksia, hemolysaattimenetelmä oli lähempänä vanhaa menetelmää kuin kokoverimenetelmä.



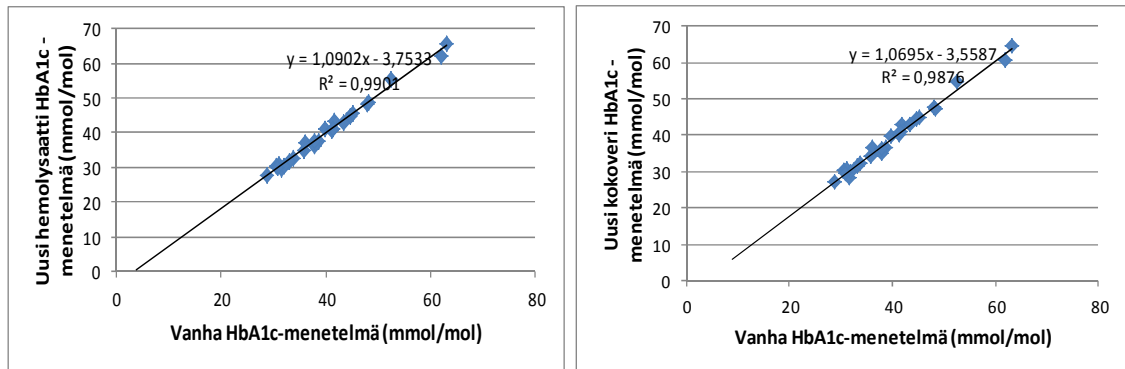
Kuva 5. Menetelmien väliset regressiosuorat: kaikki kansallisuusryhmät.

Tulosaineisto jaoteltiin seuraavaksi kansallisuusryhmittäin ja piirrettiin jokaiselle ryhmälle omat regressiokuvaajat. Suomalaisaineiston regressiosuorat on esitetty kuvassa 6. Suomalaisryhmässä olivat korkeammat selitysasteet ($R^2 = n. 0,998$).



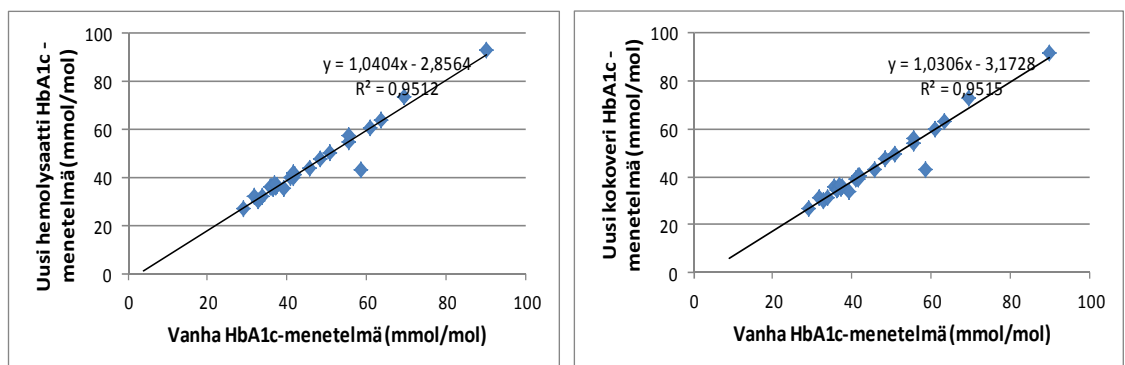
Kuva 6. Menetelmien väliset regressiosuorat: suomalaiset.

Venäläisaineiston regressiosuorat on esitetty kuvassa 7, myös tässä ryhmässä regressiomalli selitti hyvin kokonaisvaihtelua ($R^2 = n. 0,99$).



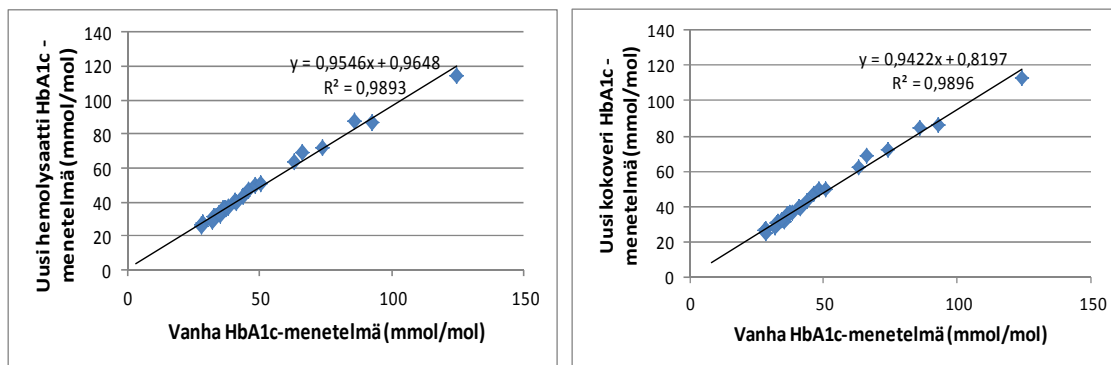
Kuva 7. Menetelmien väliset regressiosuorat: venäläiset.

Huonoin selitysaste ($R^2 = n. 0,95$) oli somalien ryhmässä (kuva 8).



Kuva 8. Menetelmien väliset regressiosuorat: somalit.

Kurdiaineiston regressiosuorat on esitetty kuvassa 9. Suorien kulmakertoimet olivat 0,94–0,95, selitysasteet noin 0,99. Muista ryhmistä poiketen y-akselin leikkauspisteet olivat positiiviset (n. 1).



Kuva 9. Menetelmien väliset regressiosuorat: kurdit.

Jos regressiosuoran kulmakerroin on noin 1, mutta suora ei kulje origon kautta, voi tuloksissa esiintyä systemaattinen vakiovirhe. Tätä testattiin Excelin parillisten tulosten 2-suuntaisella t-testillä (t-Test: Paired Two Sample for Means) 95 %:n luottamusvälejä käyttäen. Menetelmien välisillä keskiarvoilla ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, kun $t_{\text{Stat}} < t_{\text{Critical two-tail}}$ ja $P(T \leq t) \text{ two-tail} > 0,05$ [57, s. 29–31].

Sekä uuden hemolysaatti- että kokoverimenetelmän ja vanhan immunoturbidimetrisen menetelmän välillä oli kaikkia näytteitä tarkastellessa systemaattinen vakiovirhe, vanhalla menetelmällä saatujen tulosten keskiarvo oli tilastollisesti merkitsevästi erilainen (suurempi). Myös suomalaisten ja kurdien ryhmissä oli molemmilla uusilla menetelmillä systemaattinen vakiovirhe. Venäläisten ja somalien ryhmissä oli tilastollisesti merkitsevä ero keskiarvoissa vain kokoverimenetelmällä analysoidessa. Kaikissa kansallisuusryhmissä korrelaatiokertoimet (Pearson) olivat lähellä yhtä (taulukko 20) eli menetelmien välillä vallitsi hyvä lineaarinen riippuvuus. Somaleiden korrelaatiokerroin (r) oli matalin, mutta siinäkin aineistossa kerroin oli 0,975.

Taulukko 20. Parillisten tulosten 2-suuntainen t-testi, 95 %:n luottamusväli.

Kansallisuus	Sovellus	Korrelaatio-kerroin (r)	t Stat	t Critical two-tail	P(T<=t) two-tail
Kaikki	HEM	0,991	3,43	1,98	p < 0,05
Kaikki	WB	0,991	6,75	1,98	p < 0,05
Suomalaiset	HEM	0,999	3,43	2,06	p < 0,05
Suomalaiset	WB	0,999	7,68	2,06	p < 0,05
Venäläiset	HEM	0,995	0,43	2,06	ns*
Venäläiset	WB	0,994	2,96	2,06	p < 0,05
Somalit	HEM	0,975	1,46	2,06	ns*
Somalit	WB	0,975	2,64	2,06	p < 0,05
Kurdit	HEM	0,995	2,40	2,06	p < 0,05
Kurdit	WB	0,995	3,74	2,06	p < 0,05

*ns = not significant, ei merkitsevää eroa

Tuloksista laskettiin menetelmien väliset keskiarvoeroavuudet (ero-%). Koska vertailumenetelmänä ei ollut varsinainen referenssimenetelmä, käytetään tässä termiä menetelmien välinen ero (Difference) eikä poikkeama (Bias). Ero-% laskettiin vähentämällä uudella menetelmällä saadusta tuloksesta vanhan menetelmän antama tulos, jakamalla saatu erotus tulosten keskiarvolla ja kertomalla tulos 100 %:lla. [52, s. 4–12.] Keskiarvoerojen luottamusvälit (95 %) laskettiin kaavalla 6:

$$\bar{x} \pm z \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

\bar{x} on keskiarvo ero-%

z on 1,96

s on erotusten keskihajonta (SD)

n on näytteiden lukumäärä

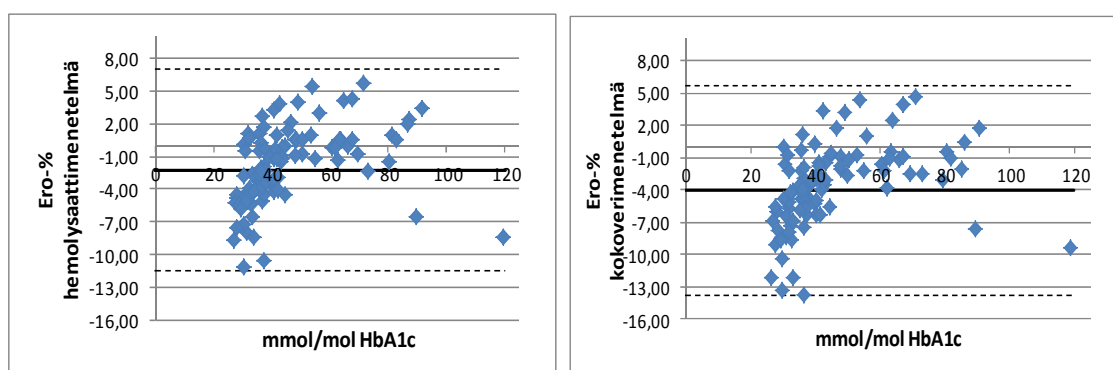
$\frac{s}{\sqrt{n}}$ on keskiarvon keskivirhe (S).

Taulukkoon 21 on koottu hemolysaatti-/kokoverimenetelmien kansallisuusryhmittäiset keskiarvoerotukset referenssimenetelmänä pidetystä vanhasta menetelmästä. Kaikki erot olivat negatiivisia eli uusien menetelmien tulostasoa on vanhaa menetelmää matalampi. Hemolysaattimenetelmä antoi hieman kokoverimenetelmää korkeampia tuloksia ja oli siten lähempänä vanhaa tulostasoa. Suomalaisen ryhmässä yksittäinen tulostasoltaan poikkeava näyte kasvatti eroa, venäläisten ryhmässä oli pienin menetelmien välinen ero-% ja keskihajonta. Somaleiden ryhmässä oli suurin erotusten välinen keskihajonta.

Taulukko 21. Uuden (HEM, WB) ja vanhan menetelmän välisten erotusten keskiarvot, erotusten keskihajonnat (SD), keskiarvon keskivirheet ja keskiarvoerotuksen 95 %:n luottamusvälit.

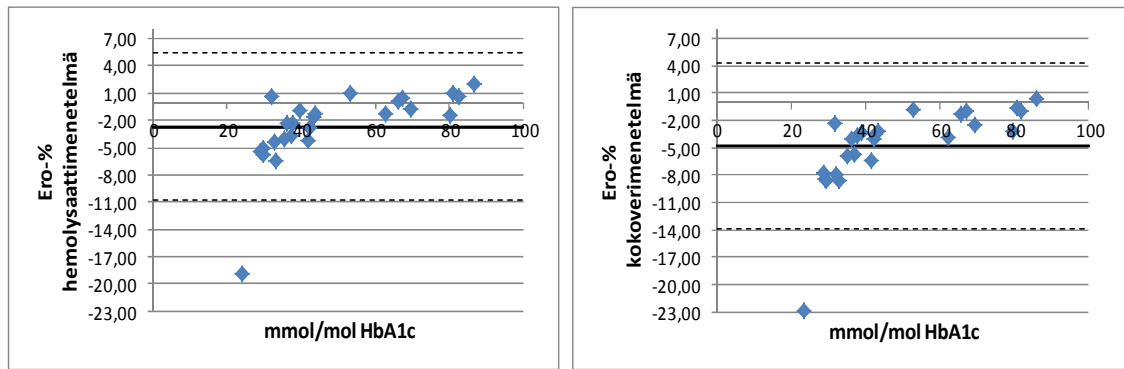
Kansallisuus	Menetelmä	Keskiarvoerotus (ero-%)	Erotusten SD (%)	Keski- virhe (S)	Keskiarvoeron alempi luottamusväli	Keskiarvoeron ylempi luottamusväli
Kaikki	HEM	-2,3	4,7	0,5	-3,2	-1,3
Kaikki	WB	-4,1	5,0	0,5	-5,0	-3,1
Suomalaiset	HEM	-2,7	4,1	0,8	-4,3	-1,1
Suomalaiset	WB	-4,8	4,7	0,9	-6,6	-3,0
Venäläiset	HEM	-0,8	3,2	0,6	-2,0	0,5
Venäläiset	WB	-2,4	3,4	0,7	-3,7	-1,0
Somalit	HEM	-2,8	6,8	1,4	-5,4	-0,1
Somalit	WB	-4,5	6,8	1,4	-7,2	-1,9
Kurdit	HEM	-2,9	4,0	0,8	-4,4	-1,3
Kurdit	WB	-4,5	4,4	0,9	-6,3	-2,8

Kuvassa 10 on kaikkien näytteiden (n = 100) tulosten menetelmien väliset erot pitoisuuden suhteen eli Bland-Altman-kuvaajina esitettyinä.



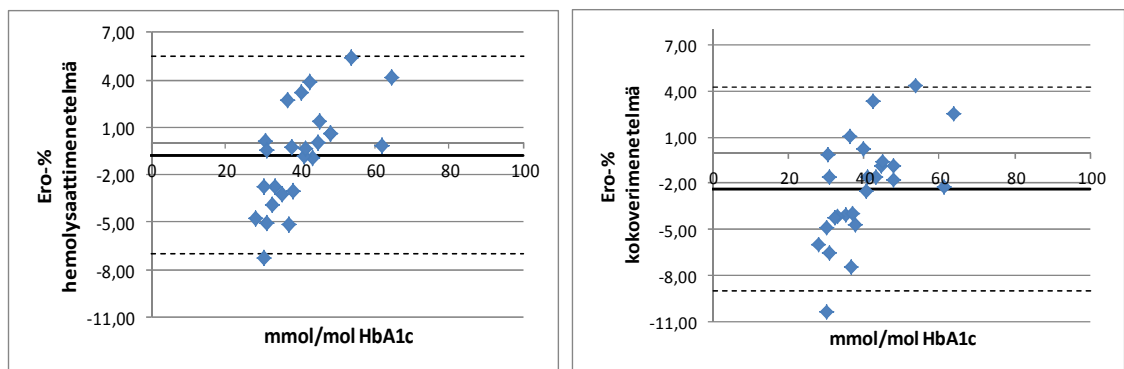
Kuva 10. Uusien hemolysaatti- ja kokoverimenetelmien eroavuus (ero-%) vanhasta immunoturbidimetrisestä menetelmästä: kaikki kansallisuudet.

Kuvassa 11 on esitetty suomalaisten näytteiden tulosten eroavuus vanhasta menetelmästä. Bland-Altman-kuvaajassa näkyy mahdollisesti konsentraation suhteen jakautumista, suuremmilla pitoisuuksilla erot ovat keskittyneet keskiarvon yläpuolelle, pienemmillä pitoisuuksilla erot ovat negatiivisemmat.



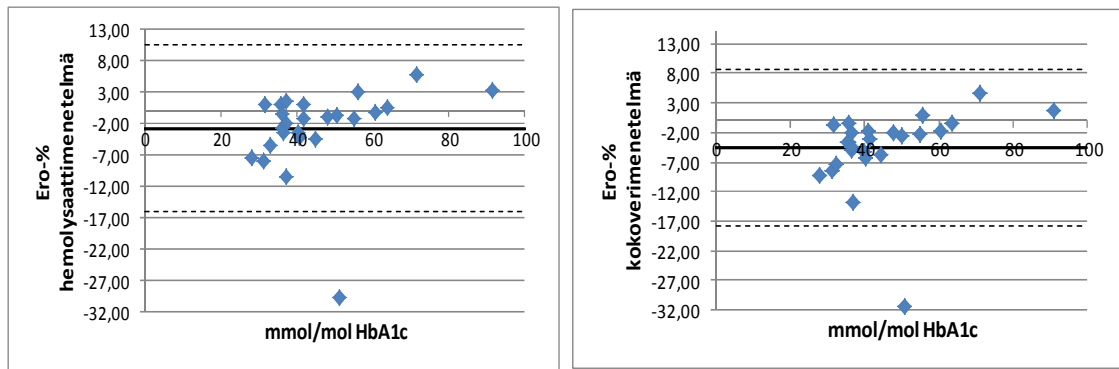
Kuva 11. Hemolysaatti- ja kokoverimenetelmien Bland-Altman-kuvaajat: suomalaiset.

Venäläisten tulokset olivat jakautuneet tasaisemmin keskiarvoeron molemmille puolille (kuva 12). Toisaalta tässä aineistossa ei ollut yhtä korkeita HbA_{1c}-pitoisuuksia kuin suomalaisessa.



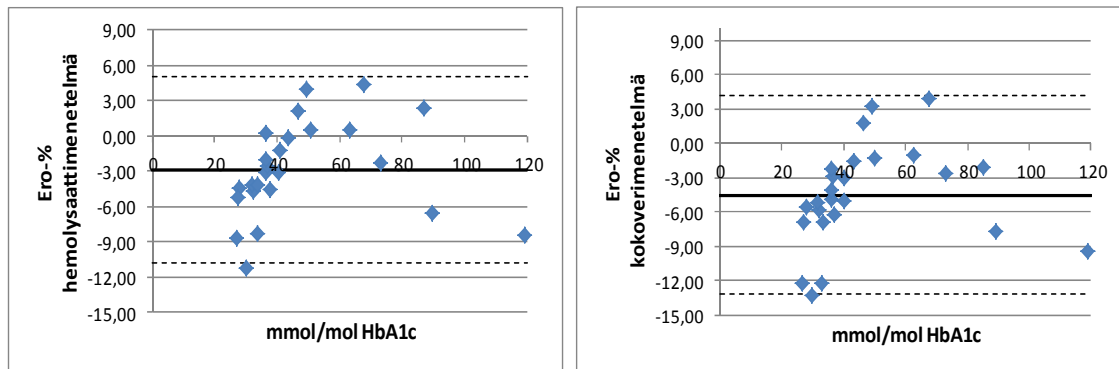
Kuva 12. Hemolysaatti- ja kokoverimenetelmien Bland-Altman-kuvaajat: venäläiset.

Somalien Bland-Altman-kuvaaja (kuva 13) muistuttaa jakaumaltaan suomalaisten kuvaajaa. Mukana oli yksittäinen tulostasoltaan menetelmäkohtaisesti huomattavasti eronnut näyte. Eroavuuksien keskihajonta oli suurin tässä ryhmässä.



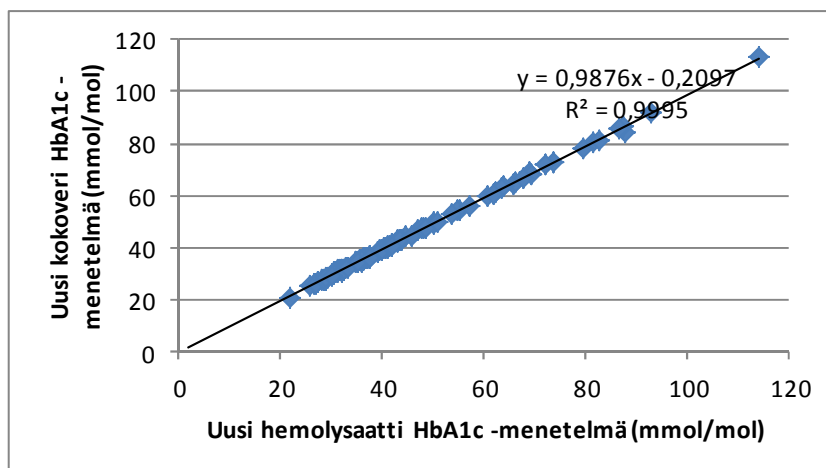
Kuva 13. Hemolysaatti- ja kokoverimenetelmien Bland-Altman-kuvaajat: somalit.

Kurdien tuloksissa (kuva 14) ei näkynyt konsentraation suhteen selkeää keskittymistä. Osa näytteistä poikkesi huomattavasti keskiarvosta.



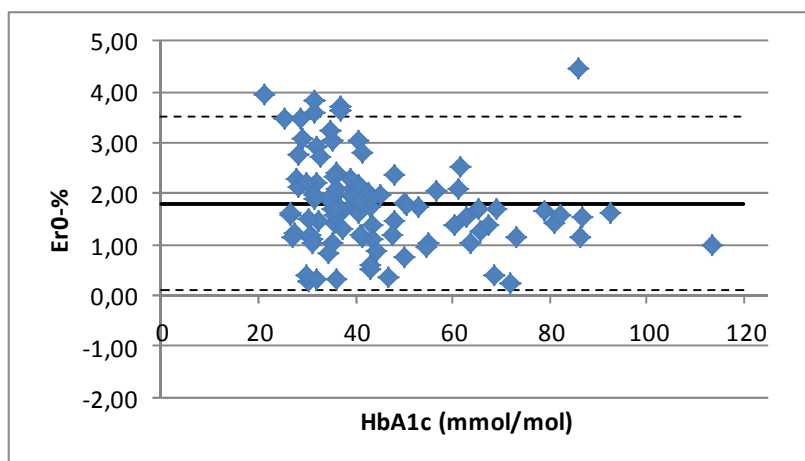
Kuva 14. Hemolysaatti- ja kokoverimenetelmien Bland-Altman-kuvaajat: kurdit.

Uuden hemolysaatti- ja kokoverimenetelmän välillä vallitsi erinomainen korrelaatio (kuva 15). Hemolysaattimenetelmällä saatiin hieman korkeampaa tulostasoa kuin automaattisella kokoverimenetelmällä (y-akselin leikkauspiste: $-0,2097$).



Kuva 15. Uuden hemolysaatti- ja kokoverimenetelmän välinen regressiosuora (n = 100).

Menetelmien välinen keskiarvoero oli 1,8 %, keskiarvon 95 %:n luottamusväli 1,6–2,0 %, erotusten keskihajonta 0,9 % ja keskiarvon keskivirhe 0,1 (kuva 16).

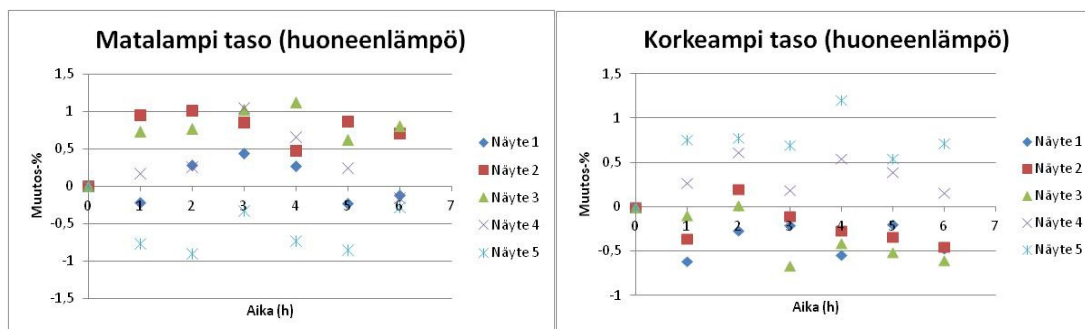


Kuva 16. Hemolysaatti- ja kokoverimenetelmän välinen ero-%. Bland-Altman-kuvaaja.

4.9 Säilyvyys

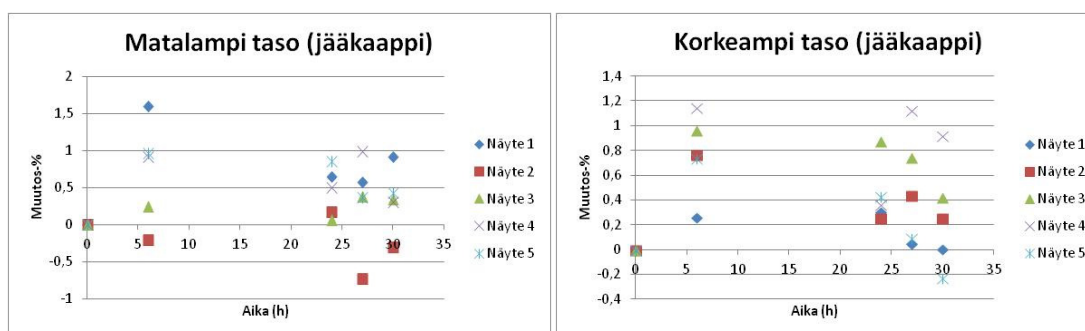
Hemolysaatinäytteiden säilyvyyttä tutkittiin 17.–18.10.2013 välisenä aikana. Valmistajan mukaan hemolysaatit säilyvät 4 h huoneenlämmössä ja 24 h +2–8 °C:ssa [3, s. 2]. Menetelmävertailussa analysoiduista 20 hemolysaatinäytteestä 10 jätettiin huoneenlämpöön (n. 23 °C) ja 10 laitettiin jääkaappiin (n. 5 °C). Näytteet korkitettiin. Huoneenlämmössä ja jääkaapissa säilytettäväksi näytteiksi valittiin suunnilleen samantasoisia näytteitä, jotta molemmissa lämpötiloissa olisi sekä matalamman että korkeamman

pitoisuuden sisältäviä näytteitä. Huoneenlämmössä säilytettyjä näytteitä analysoitiin 1 h välein 6 h asti. Jääkaapissa säilytettyjä analysoitiin 6, 24, 27 ja 30 h välein. Näytteet analysoitiin rinnakkaisina. Tuloksia tarkasteltiin jakamalla näytteet matalampaan (n. 28–41 mmol/mol HbA_{1c}) ja korkeampaan tasoon (n. 42–115 mmol/mol HbA_{1c}), 5 kpl näytteitä/taso. Huoneenlämmössä säilytetyissä näytteissä ei tutkimusaikana havaittu selkeitä suuntaavia muutoksia säilyvyydessä kummallakaan pitoisuustasolla (kuva 17) ja muutos-%:t olivat hyvin pieniä (–0,9–1,2 %).



Kuva 17. Huoneenlämmössä säilytettyjen näytteiden pitoisuuden (mmol/mol HbA_{1c}) muutos-%:t matalamman tason (n = 5) ja korkeamman tason (n = 5) näytteissä.

Jääkaapissa säilytetyissä näytteissä muutos-%:t olivat enimmäkseen positiivisia (kuva 18) eli pitoisuudet kasvoivat hivenen. Muutos-%:t olivat kuitenkin edelleen hyvin pieniä, –0,7–1,6 %, eikä niissä näkynyt selkeää nousevaa/laskevaa trendiä.



Kuva 18. Jääkaapissa säilytettyjen näytteiden pitoisuuden (mmol/mol HbA_{1c}) muutos-%:t matalamman tason (n = 5) ja korkeamman tason (n = 5) näytteissä.

4.10 Mittausepävarmuus

Analyttisten mittausten virheet ovat peräisin useista lähteistä ja syntyvät eri organisaitiotasoilla. Mittausten satunnaisvirhe näkyy tulosten toistettavuudessa. Ajon/sarjan sisäinen toistettavuus pitää sisällään kaikki ajon sisällä vaihtelevat analysointiprosessiin vaikuttavat tekijät, kuten esimerkiksi gravimetriset ja tilavuuteen liittyvät mittausvirheet, näytemateriaalin heterogeenisuuden ja variaatiot analyysin kemiallisissa käsittelyvaiheissa. Ajon vaikutus näkyy poikkeamana yhdessä ajossa ja satunnaisvaihteluna useassa ajossa. Analyttisessä mittaussysteemissä on päivien välistä vaihtelua, kuten muutoksia analysoijissa, kalibroinnissa, reagenssierissä tai laboratorio-olosuhteissa. Laboratorion vaikutus näkyy yksittäisen laboratorion poikkeamana muista laboratorioista. Laboratorioiden väliset erot voivat syntyä eroista kalibrointistandardeissa, laitteissa ja välineissä tai analyysiprotokollan paikallisessa tulkinnassa tai erilaisista ympäristötekijöistä. Analyysimenetelmässä voi olla systemaattinen poikkeama (Bias), ja myös matriisinvaihtelulla on oma vaikutuksensa tuloksiin. Menetelmän suorituskyky voi vaihdella analyttin pitoisuuden funktiona ja pitäisi siksi aina tarkistaa. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi pitoisuusalueen ääripäitä tai lineaarisuutta tutkimalla. [51, s. 840–842.]

Tämän validoinnin aikana käytettävissä ei ollut varmennettua vertailumateriaalia, joten analyysimenetelmän mittausepävarmuusarvio laskettiin laajennetun mittausepävarmuuslaskentakaaavan (kaava 7) mukaisesti käyttäen poikkeama-%:na IFCC-referenssiarvon omaavien Labqualityn kierrosnäytteiden omien mittaustulosten ja referenssiarvojen välistä eroa. [50, s. 4].

$$\sqrt{\text{sarjan sisäinen } CV \%^2 + \text{sarjojen välinen } CV \%^2 + \left(\sqrt{\left(\frac{\text{Bias } \%}{2}\right)^2 + SD \%^2}\right)^2 \times 2} \quad (7)$$

Hemolysaattimenetelmän mittausepävarmuuslaskelmaan lisättiin vielä esikäsittelyvaiheeseen liittyvän yksilöllisen kädenjäljen vaikutuksen testauksesta saatu keskinäisten tulosten suhteellisen keskihajonnan (CV-%) keskiarvo: 0,3 %. Mittausepävarmuusarviot laskettiin erikseen kahdelle eri pitoisuustasolle. Labqualityn kierrosnäytteet jaettiin ryhmiin ≤ 53 mmol/mol ja > 53 mmol/mol. Sarjan sisäiset ja väliset CV-%:t saatiin laboratorion sisäisen uusittavuustestauksen keskihajontatuloksista. Uuden entsymaattisen HbA_{1c} -menetelmän mittausepävarmuus on matalalla näytetasolla noin 8 % ja korkeammalla tasolla noin 5 % (taulukko 22). Vanhan immunoturbidimetrisen menetelmän

mittausepävarmuusarvio oli vuoden 2009 validoinnissa noin 14 %. Vanhalle menetelmälle ei ole arvioitu erikseen mittausepävarmuutta eri pitoisuusalueille.

Taulukko 22. HbA_{1c}-menetelmän mittausepävarmuusarvio ja laskennassa käytetyt arvot.

Taso	HEM WB	ka Bias-%	SD-%	Näyte	Sarjan sis. CV-%	Sarjojen väl. CV-%	Esi-käsittely CV-%	Mittausepävarmuus %
Matalampi taso	HEM	1,2	3,2	L-taso	0,4	0,7	0,3	6,7
	WB	0,3	3,7	JS	0,5	1,0	-	7,6
Korkeampi taso	HEM	1,8	1,2	H-taso	0,3	0,4	0,3	3,2
	WB	1,0	1,1	14D	0,4	1,9	-	4,5

Hemolysaatti- ja kokoverimenetelmän toistettavuusmittauksissa käytettiin eri näytteitä, joten tulokset eivät ole suoraan vertailukelpoisia, mutta sovellusten epävarmuusarviot ovat suurin piirtein samaa luokkaa. Mittausepävarmuusarviota tarkennetaan menetelmän käyttöönoton aikana. Tällä hetkellä käytössä oli tuloksia vasta neljältä Labqualityn kierrokselta ja toistettavuustesteissa ei ole ollut riittävästi variaatiota, esimerkiksi sama henkilö on suorittanut kaikki mittaukset ja reagenssi- ja kalibraattorierät eivät ole vaihtuneet kertaakaan tutkimuksen aikana.

5 Yhteenveto

Opinnäytetyössä validoitiin Abbottin uutta entsyymaattista HbA_{1c}-menetelmää, jolla korvataan markkinoilta poistuva vanha immunoturbidimetrinen määrittämenetelmä. Validoinnissa testattiin menetelmän tarkkuutta eli oikeellisuutta ja toistettavuutta ja esikäsittelyjen näytteiden säilyvyyttä sekä laskettiin menetelmälle lopuksi mittausepävarmuusarvio kahdelle eri pitoisuustasolle. Menetelmän toistettavuus oli validointitulosten perusteella erittäin hyvä. Sarjan sisäinen ja sarjojen/päivien välinen sekä kokonaistoistettavuus täyttivät kaikki annetut tarkkuuskriteerit. On kuitenkin huomattava, että validoinnin aikana ei toistettavuuteen liittyvissä tekijöissä esiintynyt suurta vaihtelua, esimerkiksi kaikki reagenssi-, kontrolli- ja kalibraattorierät säilyivät samoina ja yksi henkilö suoritti lähes kaikki analyysit. Menetelmän häiriönkestävyyttä ei sinänsä tutkittu muutoin kuin vertaamalla keskenään kahden eri esikäsittelijän hemolysaattinäytteistä saatuja tuloksia. Henkilöiden välisissä tuloksissa ei ollut suurta eroa, keskinäisten tulosten suhteellisen keskihajonnan keskiarvo oli hyvin pieni (CV-% = 0,3) ja menetelmä oli tältä osin hyvin häiriönkestävä.

Menetelmä kalibroitiin validointiaikana kahdesti, mutta kalibroinnit olivat keskenään niin samankaltaiset, ettei tästä syntynyt juurikaan vaihtelua. Normaalisti kalibroinnin merkitys on erittäin suuri ja tulostasossa voi olla huomattaviakin lot-kohtaisia eroja. Menetelmän oikeellisuutta tutkittiin analysoimalla Labqualityn vuoden 2013 Hemoglobiini A1c -kierroksilta saatuja ulkoisia laadunarvionnäytteitä. Saatuja analysointituloksia verrattiin ERLGH:n antamiin IFCC (mmol/mol) - ja DCCT (%) -referenssiarvoihin. Näytteitä analysoitiin neljältä eri kierrokselta, ja näistä laskettu keskiarvopoikkeama mmol/mol-tuloksissa oli hemolysaattimenetelmällä noin 2 % ja kokoverimenetelmällä noin 1 %. Tulokset olivat hyvät, vaikka keskiarvojen keskihajonnat varsinkin matalammalla tasolla olivat suurehkoja (SD n. 4 %), koska poikkeamat vaihtelivat eri kierroksilla negatiivisesta positiiviseen. Tässä vaiheessa tuloksia on kuitenkin vielä hyvin vähän ja menetelmän oikeellisuustietoa kerätään osallistumalla jatkossakin Labquality-kierroksille.

Tulevaisuudessa saattaa olla tarvetta osallistua myös jollekin uudelle kansainväliselle kokoverinäytteitä käyttävälle laadunvalvontakierrokselle, koska Labqualityn neljästä kierrosnäytteestä kaksi on lyofilisoituja näytteitä, jotka eivät toistaiseksi tuntemattomasta syystä tunnu soveltuvan uudelle menetelmälle. Validoinnin aikana ilmeni, että lyofilisoiduista näytteistä saadut tulokset ovat vanhan menetelmän antamia tuloksia huomattavasti matalampia ja vaatisivat oman menetelmäkohtaisen tavoitearvovälin. Tämä havainto johti myös uusien laboratorion sisäisten kahden tason kokoverikontrollien tarpeeseen. Henkilöstön joukosta löydettiin sopivat vapaaehtoiset luovuttajat, joilta otettiin verta uusien kontrolleja varten. Uudet kerta-annospakasteputkiin jaetut kontrollit ovat normaalin ja diabeettisen tason kontrolleja. Matalalta tasolta puuttuu vielä sopiva kokoverikontrolli.

Uuden entsymaattisen HbA_{1c}-menetelmän mittausepävarmuus (n. 8 % matalalla näytemäärällä) arvioitiin hieman vanhaa menetelmää (n. 14 %) pienemmäksi. Arviota tarkennetaan menetelmän käyttöönoton aikana, kun saadaan enemmän tuloksia esimerkiksi ulkoisilta laadunarviontikierroksilta ja kontrollitilastoista.

Näytteiden säilyvyyttä selvittäessä ei tutkimuksen kestoajana havaittu suuria pitoisuusmuutoksia huoneenlämmössä tai jääkaapissa säilytetyissä hemolysaattinäytteissä. Tämän perusteella näytteet säilyvät analysointikelpoisina vähintäänkin valmistajan ilmoittaman ajan. Periaatteessa näytteet analysoidaan aina mahdollisimman tuoreina, mutta esimerkiksi laiterikon tai muun vastaavan seurauksena näytteitä voitaisiin tarvittaessa säilyttää 4 h huoneenlämmössä tai 24 h +2–8 °C:ssa.

Menetelmävertailusta saatujen tulosten perusteella havaittiin uuden entsyymaattisen menetelmän antavan vanhaa immunoturbidimetristä menetelmää matalampaa tulosta-soa. Menetelmien välisissä keskiarvoissa oli tilastollisestikin merkitsevä ero. Bland-Altman-kuvaajissa näkyi mahdollisesti konsentraatiosta riippuvaa keskittymistä, pienemmillä pitoisuuksilla erot olivat negatiivisempia kuin suuremmilla. Uuden hemolysaatti- ja kokoverimenetelmän ja vanhan menetelmän väliset korrelaatiokertoimet olivat hyvät (lähellä yhtä) ja menetelmien välillä vallitsi selkeä lineaarinen riippuvuus. Uusi hemolysaatti- ja kokoverimenetelmä olivat keskenään hyvin linjassa, vaikkakin hemolysaattimenetelmällä saatiin pari prosenttia korkeampia tuloksia.

Eri kansallisuusryhmien välillä ei nähty selkeitä eroja, yksittäisiä poikkeavia näytteitä esiintyi suomalaisessakin ryhmässä, vaikka etukäteen arveltiin erojen olevan suurempia todennäköisemmin hemoglobiнопatioita sisältävissä ryhmissä, kuten kurdeilla ja somaleilla. Somaliryhmässä olivatkin suurimmat ero-%:ien keskihajonnat ja heikoin menetelmien välinen korrelaatiokerroin ($r = 0,975$). Suomalaisen ryhmässä oli paras korrelaatiokerroin ($r = 0,999$), venäläisten ja kurdien korrelaatiot olivat keskenään samaa luokkaa ($r = 0,995$).

Olisi mielenkiintoista tietää, johtuivatko yksittäisten näytteiden menetelmien väliset suuret erot niissä esiintyvistä hemoglobiнопatioista tai talassemioista. HbS- ja HbC-variantit voivat immunologisella menetelmällä antaa virheellisen korkeita tuloksia [46]. HbS-varianttia esiintyy esimerkiksi päiväntasaajan alueella Afrikassa ja pienillä alueilla Turkissa ja Kreikassa [17, s. 224–234], joten sitä voisi löytyä sekä kurdi- että somaliaineistosta. Myös HbC-varianttia esiintyy Afrikassa [1, s. 159], joten sitäkin voisi periaatteessa olla somaliaineistossa. Yleisin hemoglobiinipoikkeavuus Suomeen saapuneilla maahanmuuttajilla on ollut beetatalassemia [19]. Suomessa esiintyy myös omia koto-peräisiä variantteja, kuten esimerkiksi Hb Helsinki, Hb Meilahti ja Hb Vaasa [16].

Kumpikaan Abbottin HbA_{1c}-menetelmistä ei erittele poikkeavia hemoglobiinimuotoja eikä näytteistä ole tutkittu hemoglobiinivariantteja muullakaan menetelmällä. Tämän vuoksi variaation vaikutusta tuloseroihin on vaikea arvioida. Hemoglobiinirakenteita voidaan seuloa esimerkiksi isoelektrisellä fokuoinnilla, kationinvaihtokromatografiatekniikalla (HPLC) tai kapillaarielektroforeesilla [16, s. 9], mutta tällaista mahdollisuutta ei analyttisen biokemian laboratoriossa ollut. Erot menetelmien välisissä mittauksissa voivat osin johtua myös satunnaisesta mittausvirheestä. Näytteitä ei analysoitu rinnakkaisina, joten eroa voisi syntyä esimerkiksi pipetointivirheen seurauksena.

Toisaalta näytteet oli kertaalleen analysoitu vanhalla menetelmällä jo aiemmin eikä nyt saaduissa tuloksissa ollut suurta muutosta näihin tuloksiin verrattuna. On myös mahdollista, että näytteissä esiintyi muita mittausa häiritseviä yhdisteitä.

Menetelmän lineaarisuustestin tulos oli hyvä, molemmat uudet sovellukset olivat lineaarisia koko mittausalueella. Näytteitä laimennettaessa sen sijaan todettiin, että laimennoksia ei pitäisi tehdä, koska tämä saattaa vaikuttaa myös laskennalliseen $\text{HbA}_{1c}/\text{THb}$ -suhteeseen. Laimennossuora ei ollut pienillä pitoisuuksilla lineaarinen. Tarvetta laimennoksiin ei pitäisi olla, koska uudessa menetelmässä ei ole samanlaista vaatimusta THb:n suhteen kuin aiemmin. Vanhassa immunoturbidimetrisessä menetelmässä THb:n lineaarisuusalue on 4,3–14,3 mmol/l [46], jolloin aina välillä on jouduttu laimentamaan korkean THb-pitoisuuden sisältäviä näytteitä. Uuden menetelmän $\text{HbA}_{1c}/\text{THb}$ -suhteen lineaarisen mittausalueen yläraja on 15 % tai 140,45 mmol/mol HbA_{1c} . Mikäli tämän ylittäviä näytteitä tulee, joudutaan ne laimentamaan, mutta testauksen perusteella laimennossuhde ei saisi olla ainakaan suurempi kuin 1:2.

Validoinnin perusteella uusi entsyymaattinen HbA_{1c} -menetelmä voidaan ottaa käyttöön. Ainakaan toistaiseksi ei ole tarvetta asettaa uudelle menetelmälle korjauskerrointa, vaikka menetelmällä saatu taso onkin matalampi kuin vanhalla saatu. Oikeellisuusmittausten tulokset ovat kuitenkin menetelmälle asetetulla tarkkuustasolla. Tällä hetkellä käynnissä olevat projektit on tarkoitus analysoida vielä vanhalla menetelmällä, jotta ei syntyisi suurta tasoeroa kesken projektin. Uusi menetelmä otetaan varsinaisesti ensimmäiseksi käyttöön kansainvälisen diabetestutkimusprojektin näytteiden analysoinnissa.

Lähteet

- 1 Bry, L., Chen, P. C. & Sacks, D. B. 2001. Effects of Hemoglobin Variants and Chemically Modified Derivatives on Assays for Glycohemoglobin. *Clinical Chemistry*. Vol. 47:2, s. 153–163.
- 2 Manley, S. E., Round, R. A. & Smith, J. M. 2006. Calibration of HbA_{1c} and its measurement in the presence of variant haemoglobins: report on questionnaire to manufacturers. *Ann Clin Biochem*. Vol 43, s. 135–145.
- 3 Hemoglobin A_{1c} REF 4P52-21 Package Insert. December 2012. Abbott Park, Illinois: Abbott Laboratories.
- 4 Penttilä, I. & Halonen, T. 2012. Diabeteksen nykyinen laboratoriodiagnostiikka. *Kliin Lab* 5/2012, s. 100–102.
- 5 Käypä hoito -suositus. Diabetes. Verkkodokumentti. Suomalaisen Lääkäriseura Duodecimin, Suomen Sisätautilääkäreiden yhdistyksen ja Diabetesliiton Lääkäri-neuvoston asettama työryhmä. <www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/nayta_artikkeli/tunnus/hoi50056>. Päivitetty 30.11.2011. Luettu 10.9.2013.
- 6 Peacock, I. 1984. Glycosylated haemoglobin: measurement and clinical use. *Journal of Clinical Pathology*. Vol. 37, s. 841–851.
- 7 Sacks, D. B. 2008. Carbohydrates. Chapter 22. Teoksessa Burtis, C. A., Ashwood, E. R. & Bruns, D. E. (toim.). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. Sixth Edition. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- 8 Sacks, D. B., Bruns, D. E., Goldstein, D. E., Maclaren, N. K., McDonald, J. M. & Parrott, M. 2002. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry*. Vol. 48 (3), s. 436–472.
- 9 Honkasalo, M. 2009. HbA_{1c}:n yksikkö muuttuu – oletko valmis? *Diabetes ja lääkäri* 5/2009, s. 24–26.
- 10 Penttilä, I., Halonen, T., Moilanen, L. & Tiikkainen, U. 2009. Glykoituneen hemoglobiinin (HbA_{1c}) yksikön muutos kansainvälisen suosituksen mukaiseksi. *Kliin Lab* 2/2009, s. 25–31.
- 11 Chapter 1 of the latest WHO reports “Global status report on NCDs 2010”. Burden: mortality, morbidity and risk factors. 2010. Verkkodokumentti. World Health Organization. <http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_chapter1.pdf>. Luettu 30.9.2013.

- 12 Diabetes. 2013. Verkkodokumentti. World Health Organization. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html#>>. Päivitetty 3/2013. Luettu 28.9.2013.
- 13 Diabetes. 2013. Verkkodokumentti. Terveystieteiden tutkimuskeskus. <www.thl.fi/fi_FI/web/fi/aiheet/tietopakettit/diabetes>. Luettu 11.9.2013.
- 14 Koski, S. & Sund, R. 2010. Diabeetikoiden määrä lisääntyy, mutta lisäsairaudet vähenevät. Diabetes ja lääkäri 1/2010, s. 7–11.
- 15 Higgins, T., Beutler, E. & Doumas, B. T. 2008. Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. Chapter 28. Teoksessa Burtis, C. A., Ashwood, E. R. & Bruns, D. E. (toim.). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Sixth Edition. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- 16 Ahola, T. 2006. Hemoglobiinivariantit Suomessa. Moodi 1/2006, s. 8–13.
- 17 Rajamäki, A. & Salmi, T. T. 2007. Periytyvät hemolyysiset anemiat ja muut punasolupolypoikkeavuudet. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.), Veritaudit. 3., uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 18 A database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. Verkkodokumentti. HbVar. <<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>>. Haettu 13.9.2013.
- 19 Huhti, J. 1999. Maahanmuuttajan hematologiaa. Verkkodokumentti. <<http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/990114.htm>>. Luettu 23.9.2013.
- 20 Väestön ennakkotilasto. 2013. Verkkodokumentti. Tilastokeskus. <https://www.tilastokeskus.fi/til/vamuu/2013/08/vamuu_2013_08_2013-09-19_tie_001_fi.html>. 19.9.2013. Luettu 23.9.2013.
- 21 Maahanmuuton vuosikatsaus 2012. 2012. Verkkodokumentti. Sisäasiainministeriö. <http://www.migri.fi/download/43811_43667_Maahanmuuton_tilastokatsaus_2012_web.pdf>. Luettu 24.9.2013.
- 22 Forsander, A. 2012. Maahanmuutto ja maahanmuuttajat pääkaupunkiseudulla. Verkkodokumentti. Helsingin kaupunki. <<http://www.hel.fi/wps/wcm/connect/0994f3004a82976d8f7cefa69667230d/Maahanmuutto+ja+maahanmuuttajat+p%C3%A4%C3%A4kaupunkiseudulla.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0994f3004a82976d8f7cefa69667230d>>. 7.3.2012. Luettu 23.9.2013.
- 23 Jeppsson, J.-O., Kobold, U., Barr, J., Finke, A., Hoelzel, W., Hoshino, T., Miedema, K., Mosca, A., Mauri, P., Paroni, R., Thienpont, L., Umemoto, M. & Weykamp, C. 2002. Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA_{1c} in Human Blood. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Vol. 40 (1), s. 78–89.

- 24 Weykamp, C. W., Penders, T. J., Siebelder, C. W. M., Muskiet, F. A. J. & van der Slik, W. 1993. Interference of Carbamylated and Acetylated Hemoglobins in Assays of Glycohemoglobin by HPLC, Electrophoresis, Affinity Chromatography, and Enzyme Immunoassay. *Clinical Chemistry*. Vol. 39 (1), s. 138–142.
- 25 Syed, I. A. A. 2011. Glycated haemoglobin; past, present, and future are we ready for the change. *Journal of Pakistan Medical Association*. Vol. 61 (4), s. 383–388.
- 26 NGSP Home. 2010. Verkkodokumentti. <<http://www.ngsp.org/>>. The NGSP. Luettu 27.9.2013.
- 27 Saudek, C. D. & Brick, J. C. 2009. The Clinical Use of Hemoglobin A1c. *Journal of Diabetes Science and Technology*. Vol. 3 (4), s. 629–634.
- 28 Sofronescu, A.-G., Williams, L. M., Andrews, D. M. & Yusheng, Z. 2011. Unexpected Hemoglobin A_{1c} Results. *Clinical Chemistry*. Vol. 57 (2), s. 153–157.
- 29 John, W. G. 2012. Global standardisation of haemoglobin A_{1c} using metrological principles. *Clinical Biochemistry*. Vol. 45, s. 1048–1050.
- 30 Rahbar, S. 1968. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clinica Chimica Acta*. Vol. 22, s. 296–298.
- 31 Rahbar, S., Blumenfeld, O. & Ranney, H. M. 1969. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 36 (5), s. 838–843.
- 32 The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 329 (14), s. 977–986.
- 33 Sacks, D. B. 2012. Measuring and reporting hemoglobin A1c. Opinion Piece. *Clinical Biochemistry*. Vol. 45, s. 1046–1047.
- 34 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. 1998. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet*. Vol. 352, s. 837–853.
- 35 Weykamp, C. W., Mosca, A., Gillery, P. & Panteghini, M. 2011. The Analytical Goals for Hemoglobin A_{1c} Measurement in IFCC Units and National Glycohemoglobin Standardization Program Units Are Different. *Clinical Chemistry*. Vol 57 (8), s. 1204–1205.

- 36 Tiedote HbA_{1c}:n uuden yksikön käyttöönottamisesta. 2009. Verkkodokumentti. Suomen Kllinisen Kemian Yhdistys (SKKY). <<http://www.skky.fi/pdf/HbA1c-tiedote122009.pdf>>. 12/2009. Luettu 6.9.2013.
- 37 Penttilä, I. & Halonen, T. 2011. HbA_{1c}:n rinnakkaistulostuksesta luopuminen ja uudet laadunvalvonnan tavoitearajat. Kliin Lab 6/2011, s. 117.
- 38 Malekiani, C. L., Ganesan, A. & Decker, C. F. 2008. Effect of Hemoglobinopathies on Hemoglobin A_{1c} Measurements. The American Journal of Medicine. Clinical Communication to the Editor. Vol. 121 (6), s. e5.
- 39 Higgins, T. 2012. HbA_{1c} – An analyte of increasing importance. Clinical Biochemistry. Vol. 45, s. 1038–1045.
- 40 Factors that Interfere with HbA_{1c} Test Results. 2010. Verkkodokumentti. NGSP. <www.ngsp.org/interf.asp>. Luettu 17.9.2013.
- 41 Mongia, S. K., Little, R. R., Rohlfing, C. L., Hanson, S., Roberts, R. F., Owen, W. E., D'Costa, M. A., Reys, C. A., Luzzi, V. I & Roberts, W. L. 2008. Effects of Hemoglobin C and S Traits on the Results of 14 Commercial Glycated Hemoglobin Assays. American Journal of Clinical Pathology. Vol. 130, s. 136–140.
- 42 Ulkoinen laadunarviointikierros. Hemoglobiini A_{1c} 1, 2013. Lopullinen raportti. 6.3.2013. Labquality Oy.
- 43 Ulkoinen laadunarviointikierros. Hemoglobiini A_{1c} 2, 2013. Lopullinen raportti. 13.5.2013. Labquality Oy.
- 44 Ulkoinen laadunarviointikierros. Hemoglobiini A_{1c} 4, 2013. Lopullinen raportti. 27.9.2013. Labquality Oy.
- 45 Leiviskä, J. 2012. Hemoglobiini A_{1c}, glykoitunut (HbA_{1c}). Menetelmäohje. Versio 2.1. THL, KATO, TLAB, Analyyttisen biokemian laboratorio.
- 46 Hemoglobin A_{1c} REF 2K96-20 Package Insert. May 2012. Middletown, Virginia: Fisher Diagnostics.
- 47 List of NGSP Certified Methods. Verkkodokumentti. <<http://www.ngsp.org/docs/methods.pdf>>. The NGSP. Päivitetty 9/13. Luettu 27.9.2013.
- 48 Karjalainen, L. & Leiviskä, J. 2013. Hemoglobiini A_{1c}, glykoitunut (HbA_{1c}). Menetelmäohje. Versio 3.0. THL, KATO, TLAB, Analyyttisen biokemian laboratorio.
- 49 Selvin, E., Coresh, J., Jordahl, J., Boland, L. & Steffes M. W. 2005. Stability of haemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) measurements from frozen whole blood samples stored over a decade. Diabetic Medicine. Vol. 22, s. 1726–1730.

- 50 Sundvall, J. & Leiviskä, J. 2009. Validointiohje. Versio 2.1. 6.10.2009. THL, KATO, TLAB, Analyttisen biokemian laboratorio.
- 51 Thompson, M., Ellison, S. L. R. & Wood, R. 2002. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry. Vol. 74 (5), s. 835–855.
- 52 Krouwer, J. S., Tholen, D. W., Garber, C. C., Goldschmidt, H. M. J., Kroll, M. H., Linnet, K., Meier, K., Robinowitz, M. & Kennedy, J. W. 2002. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. Second Edition. EP9-A2. Vol. 22 (19). Clinical and Laboratory Standards Institute (Formerly NCCLS).
- 53 Kennedy, J. W., Carey, R. N., Coolen, R. B., Garber, C. C., Lee, H. T., Levine J. B. & Osberg, I. M. 1999. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. EP5-A. Vol. 19 (2). NCCLS.
- 54 Hemoglobin A_{1c} Calibrators [A_{1c}] Value Sheet. Lot 44129UQ05. REF 4P52-02. October 2012. Abbott Park, Illinois: Abbott Laboratories.
- 55 CELL-DYN Emerald Operator's Manual. 2010. Abbott Diagnostics Division. USA: Abbott Laboratories.
- 56 Ulkoinen laadunarviointikierros. Hemoglobiini A_{1c} 5, 2013. Lopullinen raportti. 20.11.2013. Labquality Oy.
- 57 Morgan, S. L. & Deming, S. N. 2006. Verkkodokumentti. <http://www.chem.sc.edu/faculty/morgan/resources/Excel/Excel_Guide_Morgan.pdf>. Päivitetty 7.6.2006. Luettu 3.11.2013.

Validointisuunnitelma



TERVEYDEN JA
HYVINVOINNIN LAITOS

Validointisuunnitelma

1

1 (4)

KATO/TLAB/Laura Karjalainen

01.10.2013

Validointisuunnitelma

Architectille otetaan käyttöön Abbottin uusi entsymaattinen HbA_{1c}-menetelmä. Menetelmässä analyysit voidaan suorittaa joko suoraan kokoverestä automaattisovelluksella (Whole Blood) tai valmistamalla näytteistä manuaalisesti hemolysaatit (Hemolysate) ennen analysaattorille syöttöä. Uuden menetelmän molempia sovelluksia verrataan vanhaan rutiinikäytössä olevaan immunoturbidimetrisen MULTIGENT HbA_{1c} -menetelmään. Validoinnin tarkoituksena on selvittää, ovatko uudella menetelmällä saadut tulokset tarkkoja, toistettavia ja luotettavia ja antavatko uusi ja vanha menetelmä samankaltaisia tuloksia. Validoinnin päätteeksi arvioidaan, voidaanko uusi menetelmä ottaa käyttöön.

Menetelmille määritetään tarkkuus: kokonaistoistettavuus (sarjan sisäinen ja välinen) ja oikeellisuus sekä tehdään mittausepävarmuusarvio. Lisäksi testataan hemolysaatien säilyvyyttä ja HbA_{1c}:n ja THb:n lineaarisuutta. Tuloksia verrataan valmistajan antamiin toimintakykyparametreihin ja menetelmälle asetettuihin analyttisiin tavoitteisiin (Labquality).

Aikataulu	Tulosten keräys aloitetaan lokakuun 2013 aikana ja toimintakyvyn seurantaa jatketaan menetelmän käyttöönoton ajan.
Validointiaste	Uuden menetelmän käyttöönotto. Kaupallinen, valmistajan valdimoima ja NGSP-sertifioima menetelmä. Varmistetaan menetelmän toimivuus myös analyttisen biokemian laboratoriossa.
Soveltamisala	Humaanit kokoverinäytteet. Mittausalue: 4,0–15,0 % HbA _{1c} (20,22–140,45 mmol/mol HbA _{1c}).
Laitte	Abbott Architect ci8200 –analysaattori
Toteutus	Molemmat menetelmät kalibroidaan samalla kahden pisteen kalibraattorilla ja kalibrointitaso varmistetaan ajamalla laboratorion oma sisäinen kontrolli (JS), Abbottin 2-tasokontrollit sekä Bioclinin kontrollit (normaali ja diabeettinen taso).

Sarjan sisäistä toistettavuutta arvioidaan ajamalla samassa sarjassa 10 rinnakkaista näytettä. Näytteitä analysoidaan kahdelta eri pitoisuustasolta: JS ja Bioclinin diabeettinen taso -kontrolli. Hemolysaattisovelluksen testausta varten näytteitä valmistetaan kaksinkertaiset tilavuudet (555 µl A1c-diluent + 25 µl näyte), jotta näytteitä on riittävästi toistoihin. Yhdistetään JS-kontrollin kerta-annoksiin pakattuja pakastenäytteitä, jotta näytetilavuus riittää myös kokoverisovelluksen testaukseen. Toistettavuustulosten avulla identifioidaan mahdolliset ongelmat ennen varsinaisen validoinnin suorittamista.

Menetelmän oikeellisuutta tutkitaan analysoimalla Labqualityn vuoden 2013 HbA_{1c}-laadunvalvontakierron kahta eri tasoa olevia kokoverinäytteitä, joille on olemassa IFCC- ja DCCT-jäljitettävät tavoitearvot. Labqualityn näytteet (2 kpl x 3 kierosta = 6 kpl) analysoidaan rinnakkaisnäytteinä sekä vanhalla

www.thl.fi

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos • Institutet för hälsa och välfärd • National Institute for Health and Welfare
Mannerheimintie 166, Helsinki, Finland PUPB/P.O. Box 30, FI-00271 Helsinki, puh/tel +358 20 610 6000



immunoturbidimetrisellä että uudella hemolysaattimenetelmällä. Mikäli näyttemäärä ei ole liian pieni ($< 200 \mu\text{l}$), näytteet analysoidaan myös uudella kokoverisovelluksella.

Menetelmävertailua suoritetaan viiden eri päivän aikana. Näytteitä on n. 100 kpl (n. 25 kpl/kansallisuusryhmä) ja ne ajetaan satunnaisessa järjestyksessä, 20 näytettä/pv. Pyritään saamaan näytepitoisuuksia menetelmän koko mittausalueelta. Näytteet ajetaan vanhalla menetelmällä sekä molemmilla uusilla sovelluksilla, ei ajeta rinnakkaisnäytteitä. Kontrollit ajetaan tulostason varmistamiseksi aina ennen ja jälkeen näyteajon. Lasketaan eri menetelmillä saatujen tulosten keskiarvot ja suhteelliset keskihajonnat ja tulosten suhteelliset poikkeamat. Piirretään Bland-Altman-kuvaajat (tulosten poikkeama konsentraation suhteen) ja regressiosuorat. Regressiosuoran yhtälöstä huomioidaan kulmakertoimen ja leikkauspisteen poikkeama origosta ja korrelaatiokerroin. Tutkitaan myös, onko menetelmien välillä suurempi poikkeama/ero analysoitaessa eri kansallisuusryhmistä otettuja näytteitä. Tietyissä etnisissä ryhmissä esiintyy enemmän erityisesti immunomenetelmiä häiritseviä hemoglobiinivariantteja. Uuden menetelmän pitäisi olla vähemmän häiriöherkkä.

Sarjojen välistä toistettavuutta tutkitaan ajamalla kolmen eri tason kontrollinäytteitä (2-tasokontrollit + JS) aluksi vähintään 10 päivän ajan. Näytteet ajetaan kerran päivässä rinnakkaisina näytteinä. Tulosten avulla arvioidaan "poolattua" sarjan sisäistä toistettavuutta, sarjojen välistä toistettavuutta sekä menetelmän kokonaistoistettavuutta. Sarjojen välisen toistettavuuden tutkimista jatketaan menetelmän käyttöaikana kontrollikortteja seuraamalla.

Yksilöllisen kädenjäljen vaikutusta näytteiden esikäsittelyssä tutkitaan analysoimalla 20 samaa näytettä kahden eri henkilön (Laura ja Merja) tekeminä hemolysaatteina.

Saatujen tarkkuustulosten perusteella arvioidaan menetelmien mittauserävarmuutta.

Lineaarisuutta voidaan tutkia tekemällä korkean pitoisuuden omaavasta näytteestä laimennossarja (5 pistettä). Laimennossarjan tulisi kattaa ~ koko mittausalue. Laimennokset tehdään A1c-diluentilla ja analysoidaan rinnakkaismäärityksinä. Rinnakkaismäärityksistä lasketaan keskiarvo ja suhteellinen hajonta. Tuloksista lasketaan regressiosuora pienimmän neliösumman menetelmällä. Piirretään regressiosuora ja arvioidaan lineaarisuutta tarkastelemalla residuaaleja (eli mitattujen ja suoralta laskettujen y-arvojen erotuksia).

Jos aineistosta löytyy sopiva korkean tason näyte, arvioidaan siirtymävirhettä (carry over) analysoimalla ensin kahdesti korkean tason näyte ja heti sen perään matalan tason näyte. Tuloksista lasketaan carry over-%.

Hemolysaatteja voidaan säilyttää 4 h huoneenlämmössä tai 24 h $+2-8^{\circ}\text{C}$:ssa. Hemolysaattinäytteiden säilyvyyttä tutkitaan analysoimalla kahta eri tasoa olevia näytteitä. Huoneenlämmössä säilytettyjä hemolysaatteja analysoidaan



	rinnakkaisina esimerkiksi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 tunnin välein. Jääkaapissa säilytettyjä 0, 6, 24, 28 ja 30 h välein.
Aineisto	Kertaalleen analysoituja, pakastettuja (–20 °C) projektinäytteitä, 4 eri kansallisuusryhmää edustettuna, n. 25 näytettä/kansallisuusryhmä. Labqualityn vuoden 2013 pakastetut (–20 °C) HbA _{1c} -kierrosnäytteet (6 kpl).
Vastuut	Laura vastaa suunnitelmasta, tulosten keräämisestä ja tilastollisesta käsittelystä. Laura ja Merja vastaavat Architectillä suoritettavista määrityksistä. Jaana ja Jouko valvovat työtä ja vastaavat johtopäätöksistä ja jatkotoimenpiteistä.
Tilastolliset testit	Toistettavuus-testeistä lasketaan keskiarvot, keskihajonnat ja suhteelliset keskihajonnat. Oikeellisuudesta lasketaan ero% (bias) ja suhteellinen keskihajonta. Yksisuuntainen varianssianalyysi (ANOVA): laboratorion sisäisen uusittavuuden tutkiminen. Regressioanalyysi: kahden menetelmän vertaaminen. Kahden otoksen t-testi: saavatko kaksi henkilöä toisistaan merkitsevästi poikkeavia tuloksia.
Tavoitteet	

Toistettavuus- ja täsmävyystavoitteet on ilmoitettu oheisessa taulukossa.

Labquality	Tarkkuus	Laboratorion sisäinen toistettavuus (CV-%)	Laboratorioiden välinen toistettavuus (CV-%)
HbA _{1c}	± 10 %	≤ 3 %	< 5 %

Valmistajan antamat menetelmän suorituskykyä kuvaavat parametrit:

Tarkkuus/spesifisyys:

Näytetaso	38,78–53,00 mmol/mol tai 5,7–7,0 % HbA _{1c}	> 53 mmol/mol tai > 7 % HbA _{1c}
IFCC-yksikkö (mmol/mol)	± 5 %	± 7 %
NGSP-yksikkö (%)	± 3 %	± 5 %

Laboratorion sisäinen toistettavuus eri pitoisuusalueilla:

Näytetaso	< 38,78 mmol/mol tai < 5,7 % HbA _{1c}	38,78–53,00 mmol/mol tai 5,7–7,0 % HbA _{1c}	> 53,00 mmol/mol tai > 7,0 % HbA _{1c}
IFCC-yksikkö (mmol/mol)	SD ≤ 1,42 mmol/mol	CV ≤ 3 %	CV ≤ 5,0 %
NGSP-yksikkö (%)	SD ≤ 0,13 %HbA _{1c}	CV ≤ 2 %	CV ≤ 3,5 %



TERVEYDEN JA
HYVINVOINNIN LAITOS

Validointisuunnitelma

1

4 (4)

KATO/TLAB/Laura Karjalainen

01.10.2013

Lineaarisuus ja sen sallittu vaihteluväli:

Näytetaso	< 38,78 mmol/mol tai < 5,7 % HbA _{1c}	38,78–53,00 mmol/mol tai 5,7–7,0 % HbA _{1c}	> 53,00 mmol/mol tai > 7,0 % HbA _{1c}
Toleranssi IFCC-yksikkö	± 1,53 mmol/mol	± 5 %	± 7 %
Toleranssi NGSP-yksikkö	± 0,14 %	± 3 %	± 5 %

Raportointi

Tuloksista laaditaan validointiraportti.

Käyttöönotto

Menetelmä otetaan käyttöön, jos validoinnit osoittavat, että menetelmä pystyy asetettuihin tavoitteisiin.

Laura Karjalainen

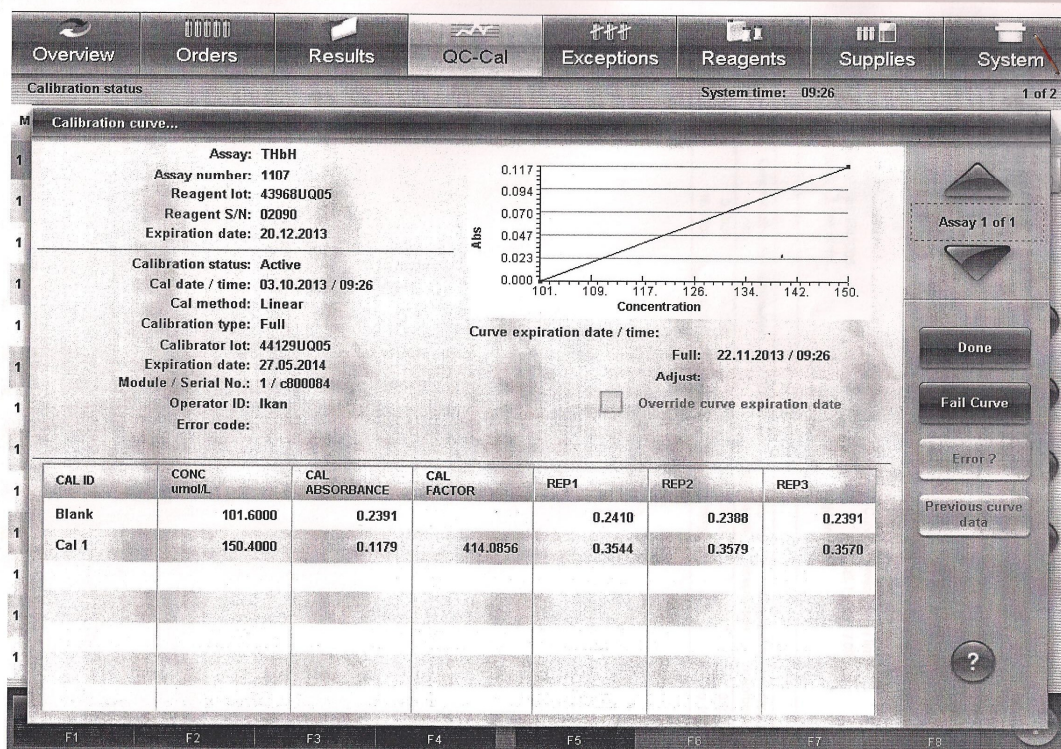
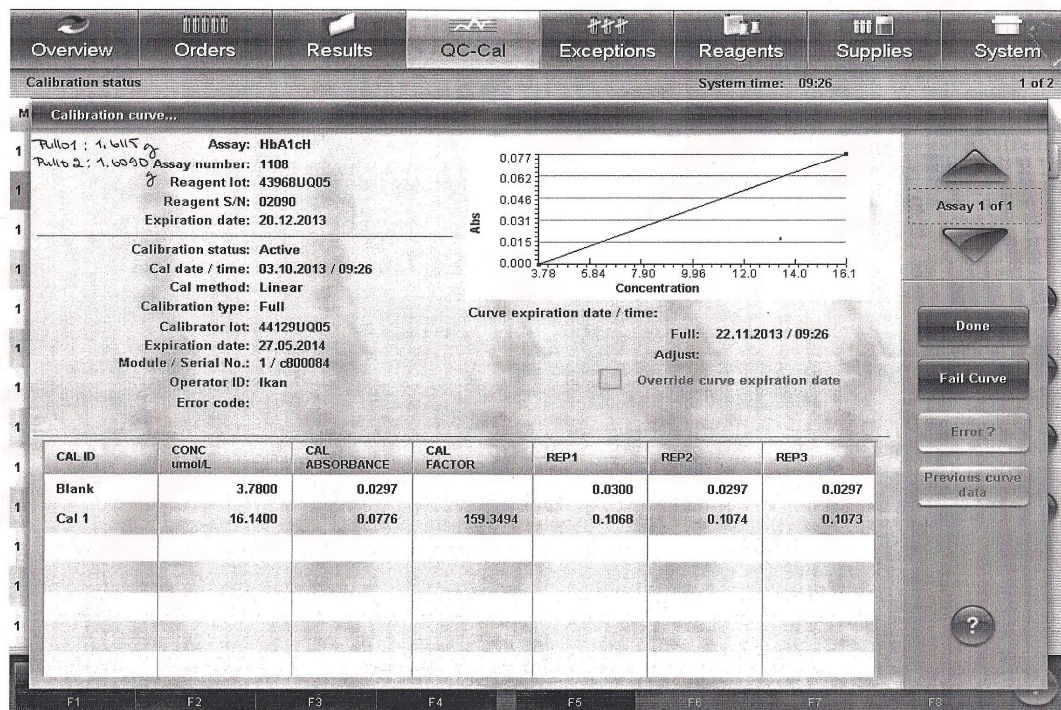
www.thl.fi

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos • Institutet för hälsa och välfärd • National Institute for Health and Welfare
Mannerheimintie 166, Helsinki, Finland PL/PB/P.O. Box 30, FI-00271 Helsinki, puh/tel +358 20 610 6000

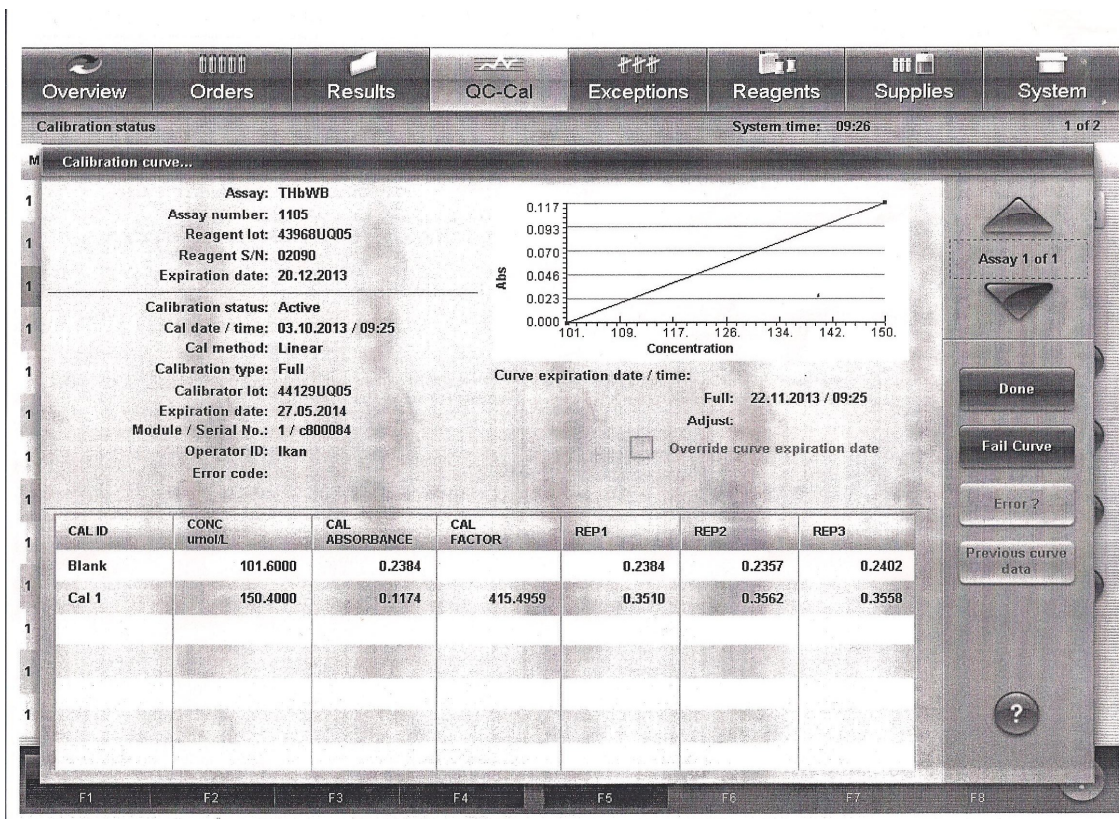
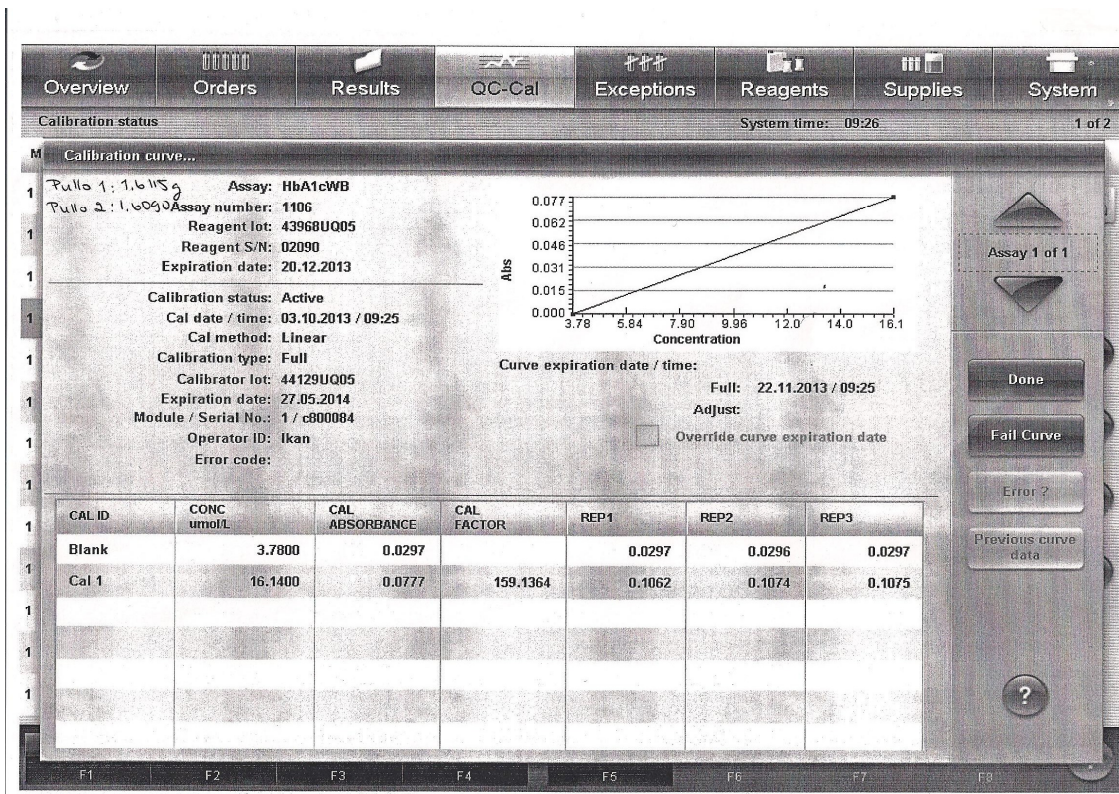
Kalibrointisuorat

Ensimmäinen kalibrointi 3.10.2013:

Hemolysaattisovellus:

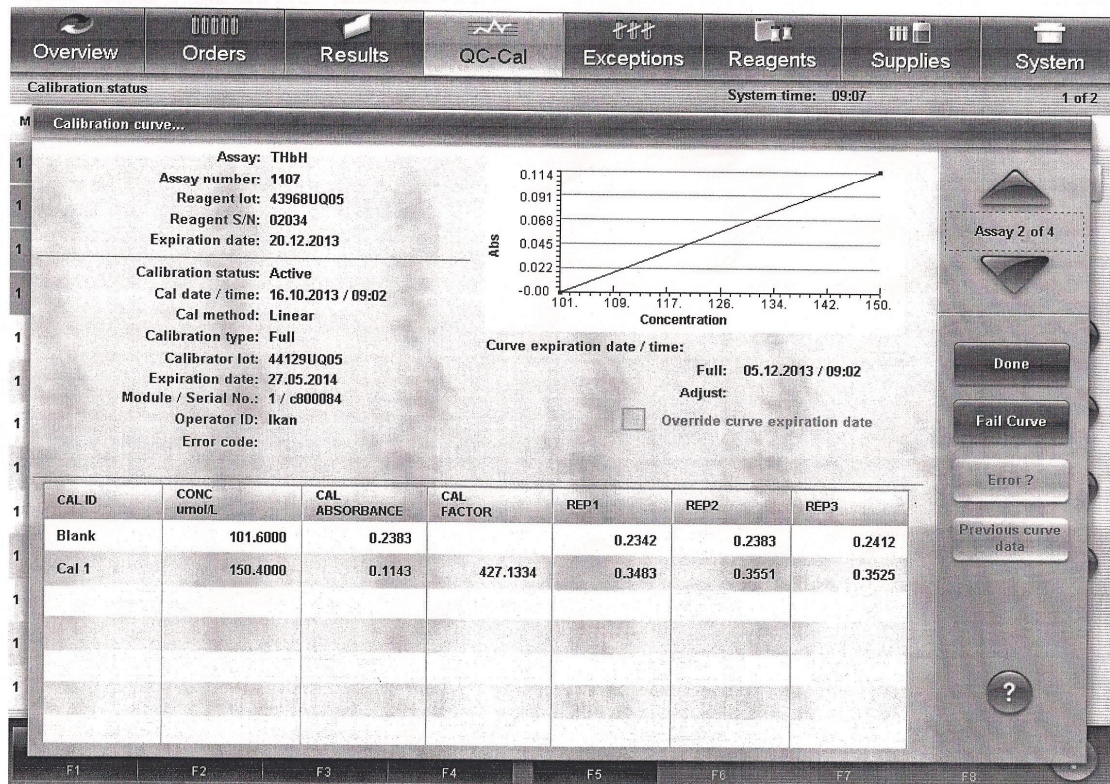
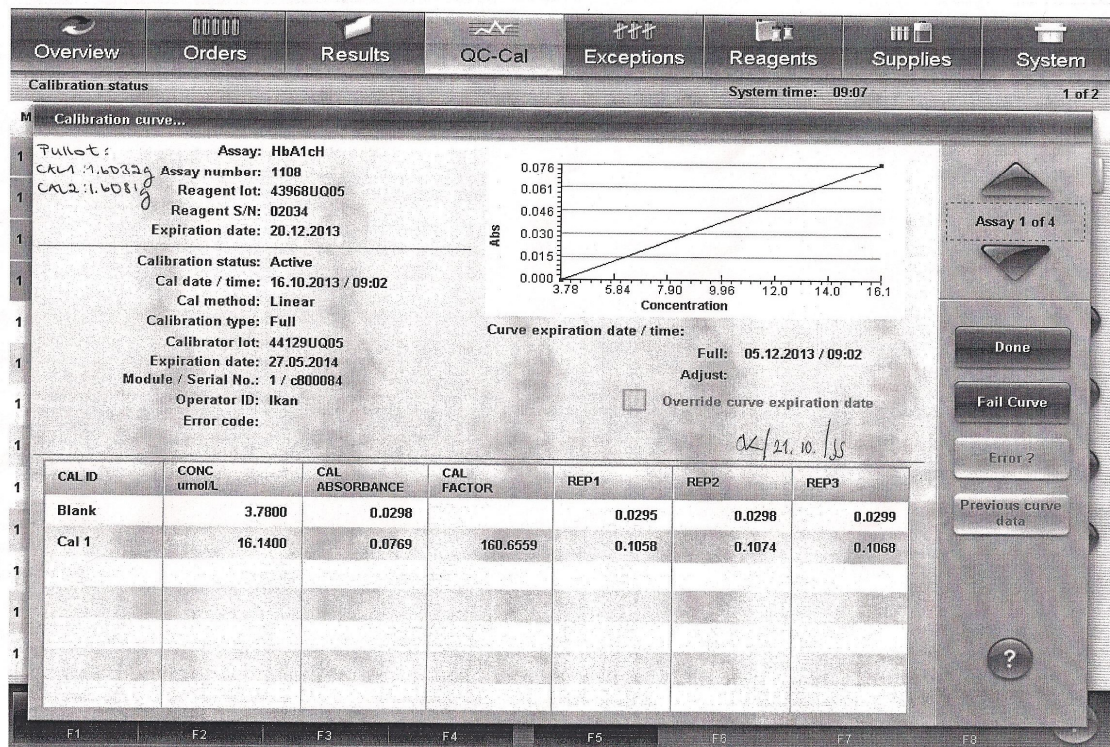


Kokoverisovellus:



Toinen kalibrointi 16.10.2013:

Hemolysaattisovellus:



Kokoverisovellus:

